

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ



دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی قزوین

دانشکده پزشکی شهید بابایی

پایان نامه جهت دریافت درجه کارشناسی ارشد انگل شناسی پزشکی

عنوان پایان نامه

بررسی مرگ سلولی برنامه ریزی شده پروتواسکولکس های کیست هیداتیک پس از مواجهه با گیاه دارویی مورد

اساتید راهنما

دکتر مجتبی شهنازی، دکتر عباس آزادمهر

اساتید مشاور

دکتر رضا حاجی آقایی، دکتر محمود علیپور حیدری

نگارش:

معظم دوستی

پاس خدای را که هر چه دارم از او ست به امید آنکه توفیق یابم جز خدمت به خلق او نکوشم.

... مدیه ای این چند برگ سبز

به گلستان با صفای روان شادان: پدر کرامی و مادر عزیزم،

جبران یک از هزار لطف ایشان نیست!

... شاید نشانه‌ی پاسگزاری و ارج نهادن به یاد و خاطره‌ی همیشگی این دو فرشته باشد!

همان که در دلمان پر مهرشان علم و ادب و نیک بودن را آموختم...

به همسرم،

به پاس قدردانی از قلبی آکنده از عشق و معرفت که محیطی سرشار از سلامت و امنیت و آرامش و آسایش برای

من فراهم آورد.

به پسرانم، همراهان همیشگی و پشوانه‌های زندگیم

تشکر و قدردانی می‌نمایم از استاد راهنمای بزرگوار و فریخته‌ام جناب آقای دکتر مجتبی شهنازی که در طی انجام این تحقیق، با سه صدر و الطاف بی‌منت خود مراد نگارش این اثر یاری نمودند.

کمال تشکر از:

جناب آقای دکتر عباس آزاد مهر که همواره از رهنمودهای ارزنده‌شان بهره‌مند بوده‌ام.

استاد مشاور کرامت جناب آقای دکتر محمود علیپور حیدری و آقای دکتر رضا حاجی آقایی، که در طول انجام این تحقیق مرایاری نموده‌اند.

استاد فرزانه جناب آقای دکتر سیرانی و همه اساتید گرامی که آموخته‌های خویش را مرهون زحمات ایشان می‌دانم.

در انتها تشکر ویژه‌ای دارم از تمامی اعضای هیئت علمی و کارکنان بخش محل شناسی که مدیون محبت بی‌دینشان می‌باشم.

چکیده فارسی:

بررسی مرگ سلولی برنامه ریزی شده پروتواسکولکس های کیست هیداتید پس از مواجهه با گیاه دارویی مورد

زمینه: انتخاب مواد پروتواسکولیسیدال موثر و کم ضرر در عمل جراحی کیست هیداتید برای بسیاری از جراحان از اهمیت فراوانی برخوردار است. در حال حاضر استفاده از گیاهان دارویی به عنوان جایگزین مواد شیمیایی مورد توجه قرار گرفته ولی علیرغم مشخص شدن اثر اسکولیسیدالی بعضی از آنها از جمله گیاه دارویی مورد (*Myrtus communis*)، مکانیسم اثر آنها که در سرنوشت بیمار می تواند تاثیر داشته باشد هنوز مشخص نشده است.

هدف: مشخص کردن احتمال مرگ سلولی برنامه ریزی شده پروتواسکولکس های کیست هیداتیک پس از مواجهه با گیاه دارویی مورد .

مواد و روشها: پس از تهیه کبد و ریه های آلوده به کیست هیداتید، با رعایت شرایط استریل محتویات کیست ها تخلیه و پروتواسکولکس ها جمع آوری شدند. برای مشخص کردن *Viability* پروتواسکولکس ها، از ائوزین ۰/۱ درصد استفاده شد. بررسی اثر عصاره گیاه مورد در مرگ سلولی برنامه ریزی شده و افزایش فعالیت کاسپاز های ۳، ۸ و ۹ از پروتواسکولکس های کیست هیداتید، با غلظت های، ۵ mg/ml، ۵۰ و ۱۰۰ گیاه مذکور، در مدت ۴ ساعت، دمای ۳۷ درجه سانتیگراد و در حضور 5% CO₂ ، با استفاده از کیت های مربوطه انجام شد .

یافته ها: عصاره گیاه مورد در تمامی رقت های مورد استفاده، باعث مرگ سلولی برنامه ریزی شده بر روی پروتواسکولکس ها شد که این اثر در مقایسه با کنترل منفی فقط در غلظت های ۵۰ mg/ml و ۱۰۰ و به ترتیب به میزان ۴۶/۶۵ و ۵۵/۲۶ درصد معنی دار بود ($P<0.05$). همچنین در بررسی اثر رقت های مختلف گیاه مذکور در افزایش فعالیت کاسپاز های ۳، ۸ و ۹ از پروتواسکولکس های تحت تاثیر، مشخص گردید که فعالیت کاسپاز های ۳ و ۹ در تمامی غلظت های مورد استفاده از گیاه فوق، افزایش یافت که این افزایش در مورد کاسپاز ۳ در غلظت های ۵۰ mg/ml و ۱۰۰ به ترتیب با ۳۷ و ۶۶/۱۹ درصد و در مورد کاسپاز ۹ در همین غلظت ها به ترتیب با ۲۰/۸۹ و ۶۳/۶۹ درصد معنی دار بود ($P<0.05$)، عصاره گیاه مورد هیچگونه افزایش قابل ملاحظه ای در فعالیت کاسپاز ۸ نداشت.

نتیجه گیری: عصاره گیاه مورد در تمامی غلظت های مورد استفاده بر روی پروتواسکولکس های کیست هیداتید، توانست همراه با افزایش فعالیت کاسپاز های ۳ و ۹، باعث مرگ سلولی برنامه ریزی شده در پروتواسکولکس ها شود که این اثر فقط در غلظت های بالاتر معنی دار بود.

کلید واژه: کیست هیداتید، پروتواسکولکس، گیاه مورد، مرگ سلولی برنامه ریزی شده، کاسپاز

فهرست مطالب

فصل اول

| | |
|---|----|
| مقدمه..... | ۱ |
| اهمیت اكينوكوكوس و هيداتيروز در علم پزشکی و دامپزشکی :..... | ۲ |
| جايگاه تاكسونوميك اكينوكوكوس :..... | ۲ |
| مورفولوژی اكينوكوكوس گرانولوزوس و خصوصيات بيولوژيك آن:..... | ۳ |
| سير تكاملی اكينوكوكوس گرانولوزوس:..... | ۷ |
| انتشار جغرافيايی و شيوع اكينوكوكوس و هيداتيروز در نقاط مختلف کره زمین:..... | ۱۱ |
| انتشار جغرافيايی و شيوع اكينوكوكوس و هيداتيروز در ايران :..... | ۱۳ |
| پاتوژنز و علائم باليني هيداتيروز :..... | ۱۵ |
| روشهای تشخيص هيداتيروز :..... | ۱۶ |
| روش های سرولوژيکی:..... | ۱۸ |
| روش های درمانی هيداتيروز :..... | ۲۲ |
| کنترل و پيشگيري :..... | ۲۳ |
| ايمونولوژی کيست هيداتيذ:..... | ۲۴ |
| پاسخ های ايمني ذاتی بر عليه کيست:..... | ۲۵ |
| پاسخ ايمني اکتسابی عليه کيست:..... | ۲۶ |
| آپوپتوزيس..... | ۲۸ |
| مسیر های آپوپتوزيس:..... | ۳۰ |

بیان مسئله:..... ۳۵

فصل دوم

مروری بر متون..... ۳۷

فصل سوم

اهداف و فرضیات:..... ۴۶

هدف اصلی..... ۴۶

اهداف فرعی..... ۴۶

اهداف کاربردی..... ۴۶

فرضیه ها (*Hypothesis*) یا سؤال های پژوهش..... ۴۶

بررسی های آماری:..... ۴۷

فصل چهارم

مواد و روش ها..... ۴۸

وسایل مصرفی :..... ۴۹

محلول ها و مواد مصرفی :..... ۴۹

روش کار :..... ۵۰

تهیه کیست های هیداتید و جدا سازی پروتواسکولکس ها:..... ۵۱

تعیین تعداد مناسب پروتواسکولکس ها جهت مواجهه با عصاره گیاه مورد:..... ۵۲

تعیین میزان پروتئین مایع رویی حاصل از لیز پروتواسکولکس ها، با استفاده از روش براد فورد:..... ۵۵

تهیه رقت های ۵ ، ۵۰ و ۱۰۰ از عصاره گیاه دارویی مورد:..... ۵۷

روش انجام آزمایش آپتوزیس بر اساس کیت : ۵۸

آماده کردن محلول های کار ۶۰

روش انجام آزمایش الایزا جهت بررسی آپتوزیس: ۶۲

روش اندازه گیری فعالیت کاسپاز ها ی ۳ ، ۸ ، و ۹ بر اساس کیت های شرکت ۶۳

خلاصه اندازه گیری ۶۵

فصل پنجم

یافته ها ۶۷

فصل ششم

بحث ۸۴

نتیجه گیری ۹۴

پیشنهادهات ۹۵

فهرست منابع: ۹۶

فهرست جداول

- جدول ۱: جدول متغیرها ۴۷
- جدول ۲: محلول های لازم و مقادیر آنها برای رسم منحنی استاندارد تست براد فورد ۵۵
- جدول ۳: محلول های لازم و مقادیر آنها برای تعیین میزان پروتئین مایع رویی حاصل از پروتواسکولکس ها ۵۶
- جدول ۴: اثر آپوتوتیک غلظت های مختلف عصاره گیاه مورد بر روی پروتواسکولکس های کیست هیداتید ۶۸
- جدول ۵: اثر غلظت های مختلف عصاره گیاه مورد بر روی پروتواسکولکس ها ی کیست هیداتید، در افزایش فعالیت کاسپاز ۳ ۷۱
- جدول ۶: اثر غلظت های مختلف عصاره گیاه مورد بر روی پروتواسکولکس های کیست هیداتید، در افزایش فعالیت کاسپاز ۹ ۷۴
- جدول ۷: اثر عصاره گیاه مورد بر روی پروتواسکولکس های کیست هیداتید، در افزایش فعالیت کاسپاز ۸ ۷۷
- جدول ۸: اثر مقایسه ای آپوتوتیک غلظت های مختلف عصاره گیاه مورد بر روی پروتواسکولکس ها ی کیست هیداتید با استفاده از تست Tukey ۸۰
- جدول ۹: اثر مقایسه ای غلظت های مختلف عصاره گیاه مورد بر روی پروتواسکولکس ها ی کیست هیداتید، در افزایش فعالیت کاسپاز ۳ با استفاده از تست Tukey ۸۱
- جدول ۱۰: اثر مقایسه ای غلظت های مختلف عصاره گیاه مورد بر روی پروتواسکولکس ها ی کیست هیداتید، در افزایش فعالیت کاسپاز ۹، با استفاده از تست Tukey ۸۲
- جدول ۱۱: اثر مقایسه ای غلظت های مختلف عصاره گیاه مورد بر روی پروتواسکولکس ها ی کیست هیداتید، در افزایش فعالیت کاسپاز ۸، با استفاده از تست Tukey ۸۳

فهرست منحنی و نمودارها

| | |
|--|----|
| منحنی ۱: منحنی کالیبراسیون تست براد فورد و مقایسه جذب نوری super nat ant حاصل از پروتواسکولکس ها با جذب نوری استانداردها..... | ۵۷ |
| نمودار ۱: اثر آپوتوتیک عصاره گیاه مورد بر روی پروتواسکولکس های کیست هیداتید بر اساس میزان جذب نوری نمونه ها در مقایسه با کنترل منفی..... | ۶۹ |
| نمودار ۲: اثر آپوتوتیک عصاره گیاه مورد بر روی پروتواسکولکس های کیست هیداتید در مقایسه با کنترل منفی بر حسب درصد..... | ۷۰ |
| نمودار ۳: اثر عصاره گیاه مورد بر روی پروتواسکولکس های کیست هیداتید، در افزایش فعالیت کاسپاز ۳ بر حسب جذب نوری..... | ۷۲ |
| نمودار ۴: اثر عصاره گیاه مورد بر روی پروتواسکولکس های کیست هیداتید، در افزایش فعالیت کاسپاز ۳ بر حسب درصد..... | ۷۳ |
| نمودار ۵: اثر عصاره گیاه مورد بر روی پروتواسکولکس های کیست هیداتید، در افزایش فعالیت کاسپاز ۹ بر حسب جذب نوری..... | ۷۵ |
| نمودار ۶: اثر عصاره گیاه مورد بر روی پروتواسکولکس های کیست هیداتید، در افزایش فعالیت کاسپاز ۹ بر حسب درصد..... | ۷۶ |
| نمودار ۷: اثر عصاره گیاه مورد بر روی پروتواسکولکس های کیست هیداتید در افزایش فعالیت کاسپاز ۸ بر حسب جذب نوری..... | ۷۸ |
| نمودار ۸: اثر عصاره گیاه مورد بر روی پروتواسکولکس های کیست هیداتید در افزایش فعالیت کاسپاز ۸ بر حسب درصد..... | ۷۹ |

فهرست تصاویر

- تصویر ۱: مورفولوژی کرم بالغ اکینوкокوس گرانولوزوس..... ۴
- تصویر ۲: تخم کرم اکینوкокوس گرانولوزوس..... ۵
- تصویر ۳: ساختمان کیست هیداتیک..... ۷
- تصویر ۴: جرخه زندگی اکینوкокوس گرانولوزوس..... ۱۰
- تصویر ۵: پراکندگی اکینوкокوس گرانولوزوس در جهان..... ۱۳
- تصویر ۶: تفاوت نکروز و آپوپتوز..... ۳۰
- تصویر ۷: فرایند آپوپتوزیس..... ۳۱
- تصویر ۸: واکنش های آبشاری فعال شدن کاسپازها توسط گیرنده های مرگ در مسیر خارجی..... ۳۲
- تصویر ۹: واکنش های آبشاری فعال شدن کاسپازها در مسیر میتوکندریایی (مسیر داخلی)..... ۳۴
- تصویر ۱۰: گیاه مورد..... ۳۸
- تصویر ۱۱: پروتواسکولکس های زنده اکینوкокوس گرانولوزوس قبل از مواجهه با عصاره گیاه مورد..... ۵۲
- تصویر ۱۲: روش تهیه رقت های سریالی از پروتواسکولکس ها..... ۵۴
- تصویر ۱۳: کیت تشخیص مرگ سلولی از طریق آپوپتوزیس (*Cell Death Detection ELISA^{PLUS} (Roche)*)..... ۶۲
- تصویر ۱۴: پروتواسکولکس های مرده کیست هیداتید بعد از مواجهه با عصاره گیاه مورد..... ۶۶

فصل اول

مقدمه

اکینوкокوزیس یا هیداتیدوز یک بیماری مشترک بین انسان و دام است که در اثر آلودگی میزبان واسط به مرحله لاروی کرمی به نام اکینوкокوس گرانولوزوس، در بدن آن ایجاد می شود. چرخه زندگی این انگل در دو میزبان اصلی (قطعی) و واسط سپری می شود. محل کرم های بالغ انگل، در روده کوچک گوشتخواران (به عنوان میزبان نهایی یا قطعی) بوده که بعد از بلوغ، تولید تخم می کنند که حاوی جنین شش قلابه (انکوسفر) می باشند. بند های رسیده حاوی تخم، توسط مدفوع سگ در محیط رها شده و پس از بلع تخم ها به وسیله میزبان های واسط (علفخواران و همچنین انسان)، مرحله لاروی (متا سستود) در ارگان های مختلف آنها از جمله کبد، ریه، مغز و تشکیل می شود. متاسستودها دارای هزاران پروتواسکولکس می باشند، که پس از بلع توسط میزبان های قطعی مناسب، هرکدام قابل تبدیل به یک کرم بالغ در روده هستند. عفونت گوشتخواران با مراحل روده ای اکینوкокوس باعث مرگ حیوان نمی شود، اما متاسستود می تواند ایجاد بیماری شدید و حتی کشنده در میزبان واسط نماید.

اکینوкокوزیس در بسیاری از نقاط دنیا پراکندگی داشته و در کشور مان ایران بومی است (۴-۱). در حال حاضر بهترین روش درمانی هیداتیدوز عمل جراحی است، لذا انتخاب مواد پروتواسکولیسیدال موثر و کم ضرر قبل از عمل جراحی و تزریق آنها به داخل کیست ها خطر نشت پروتواسکولکس های زنده را کاهش داده و برای بسیاری از جراحان از اهمیت فراوانی برخوردار است (۷-۵). در حال حاضر استفاده از مواد پروتواسکولیسیدال شیمیایی به جهت عوارض جانبی آنها محدود شده و استفاده از گیاهان دارویی به عنوان جایگزین مواد شیمیایی مورد توجه قرار گرفته است (۶، ۳، ۸، ۹).

ایمنی ذاتی انسان بر علیه کیست هیداتیک و لایه های آن بالاخص لایه ژرمینال، به عنوان یکی از مکانیسم های احتمالی در سرکوب کیست هیداتیک محسوب می شود (۱۰)، که اخیراً آپوپتوزیس به عنوان بخش مهمی از ایمنی ذاتی میزبان در سرکوب انگل های اکینوкокوس گرانولوزوس به اثبات رسیده است (۱۱) و این روش یکی از بهترین روشها در از بین بردن انگلهای اکینوкокوس می تواند باشد (۱۲).

اهمیت اکینوкокوس و هیداتیدوز در علم پزشکی و دامپزشکی :

هیداتیدوزیس یکی از مهمترین بیماریهای انگلی زئونوز بوده و انتشار جهانی دارد. بیشترین شکل اکینوкокوزیس (اکینوкокوزیس کیستیک)، در چرخه اهلی، بین سگها و علفخواران و در مناطقی رخ می دهد که پرورش سنتی دامها گسترده بوده و سگ ها به تعداد زیاد به عنوان سگ گله نگهداری می شوند، و لاشه علفخواران مرده یا امعاء و احشاء آلوده به کیست هیداتید در دسترس آنها قرار می گیرد. افرادی که سگ نگهداری می کنند و مسائل بهداشتی را رعایت نمی کنند در مقابل ابتلا به بیماری، آسیب پذیر می باشند (۱۳)، (۱۴).

هیداتیدوز یک مشکل بهداشتی - اقتصادی در جهان بوده و با تحمیل هزینه های گزاف، از بابت جراحی و درمان بیماری و همچنین کاهش کیفیت زندگی، می تواند قابل توجه باشد (۱۵). در ایران خسارات ناشی از بیماری سالانه بالغ بر ۲۳۲ میلیون دلار آمریکایی تخمین زده شده است (۱۶). مهمترین آثار بیماری در دامها، مسائل اقتصادی آن می باشد. کاهش در تولید محصولات دامی و تولید مثل می تواند خسارت های هنگفت اقتصادی به صنعت دامپروری وارد نماید (۱۷).

جایگاه تاکسونومیک اکینوкокوس :

اکینوкокوس از رده کرم های پهن نواری شکل می باشد که طبق آخرین گزارشات، تاکسونومی آن به صورت زیر می باشد:

Kingdom: Animalia
Phylum: Platyhelminthes
Class: Cestoda
Order: Cyclophyllidea
Family: Taeniidae
Genus: Echinococcus

در حال حاضر حداقل ۴ گونه برای انگل فوق شناسایی شده که از نظر مورفولوژیک و ویژگی های طبیعی با هم اختلاف دارند. شواهد مولکولی جدید، حاکی از وجود ۵ یا ۶ گونه از جنس اکینوکوکوس می باشد که عبارتند از:

E. granulosus

E. multilocularis

E. oligarthus

E. vogeli

E. equinus

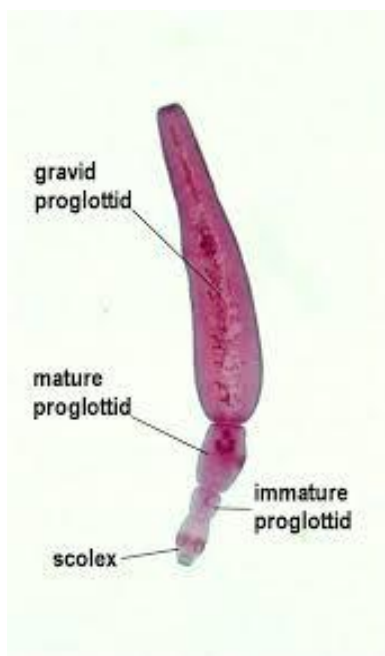
گونه ی دیگری به نام *E. shiquicus* در سال ۲۰۰۵ در چین معرفی شد که شکل بالغ آن از نظر مورفولوژی با کمی تفاوت شبیه به *E. multilocularis* می باشد (۲۰-۱۸).

مورفولوژی اکینوکوکوس گرانولوزوس و خصوصیات بیولوژیک آن:

اندازه کرم بالغ، ۳-۹mm بوده و دارای پوششی است که باعث تسهیل عمل جذب مواد غذایی می شود. بدن کرم از سه قسمت سر، گردن و بندها تشکیل شده که تفاوت های ظاهری این قسمتها در تشخیص گونه های مختلف کرم کمک کننده می باشد. اکینوکوکوس گرانولوزوس دارای یک سر (اسکولکس) کروی شکل، با چهار

بادکش فنحانی شکل و یک روستلوم با ۲۸ تا ۸۰ قلاب می باشد. بندهای این کرم توسط یک گردن باریک و کوتاه به سر، متصل می شوند. بدن کرم از ۳-۴ بند (پروگلوتید)، تشکیل شده که به ترتیب بند اول، بند نارس، بند دوم، بند رسیده یا بالغ بوده که حاوی اندامهای تناسلی نر و ماده می باشد. بند سوم و (گاهی چهارم) بند بارور نام دارد که قسمت انتهایی بدن کرم را تشکیل می دهد و حاوی رحم با یک تنه اصلی و تعداد ۱۲ تا ۱۵ انشعاب جانبی کوتاه بوده و داخل آنها انباشته از تخم انگل (حدود ۵۰۰۰ عدد) می باشد. سوراخ های تناسلی به طور متناوب و نامنظم در قسمت جانبی بندها قرار گرفته و تعداد بیضه ها ۴۵ تا ۶۵ عدد و تخمدان دو قسمتی است، و در عقب آن غدد وتیلوزن قرار دارد (تصویر ۱).

تخم این کرم کاملاً شبیه تخم سایر تنیاهای بوده و به شکل گرد متمایل به بیضی به اندازه ۳۸-۳۰ میکرون و



دارای جدار خارجی قطور و مخطط می باشد که در داخل تخم، جنین ۶ قلابه وجود دارد (تصویر ۲).

تصویر ۱: مورفولوژی کرم بالغ اکینووکوکوس گرانولوزوس



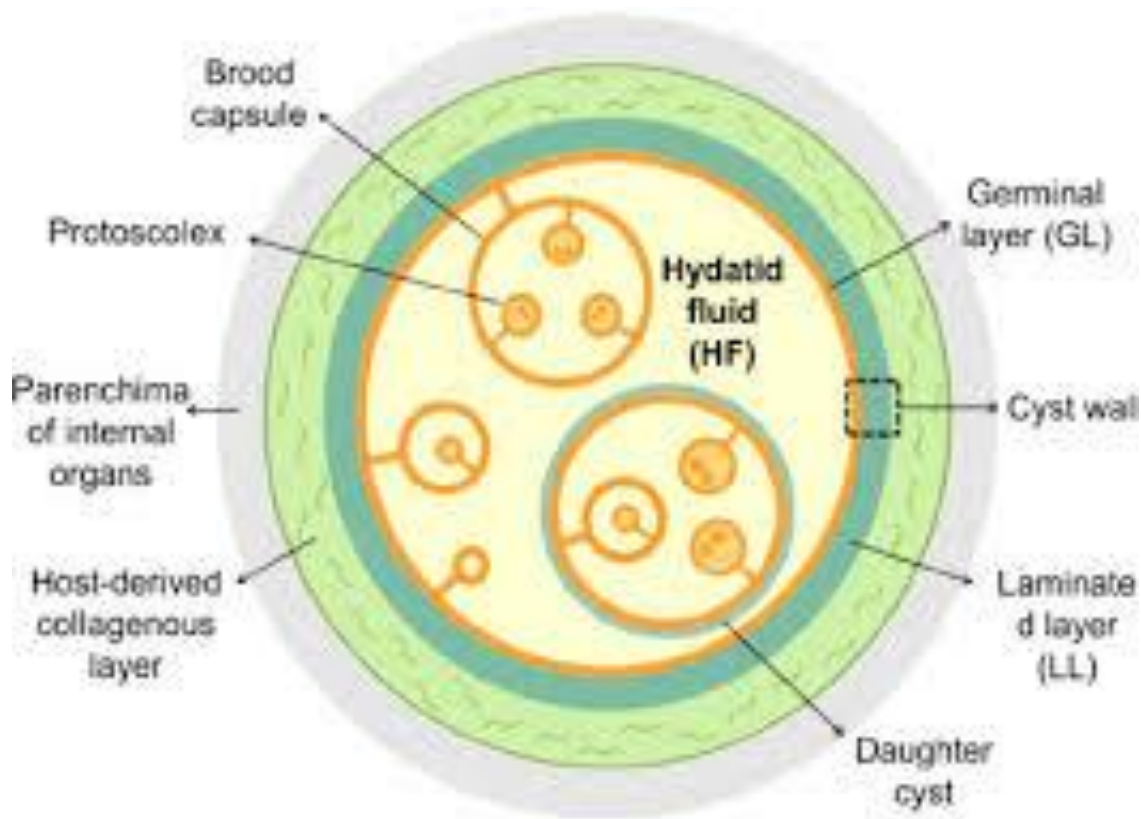
تصویر ۲: تخم کرم اکینوкокوس گرانولوزوس

به مرحله لاروی اکینوкокوس گرانولوزوس که در داخل بدن میزبان واسط (از جمله علفخواران و انسان) تشکیل می شود، کیست هیداتیک گفته می شود. به طور کلی این کیست شامل تعداد زیادی پروتواسکولکس، به همراه کپسول های جوانه ای و کیست های دختر می باشد. ساختمان این کیست از دولایه تشکیل شده که به ترتیب از خارج به داخل به صورت زیر می باشد:

لایه خارجی: این لایه یک لایه پوششی کوتیکولی محافظ از جنس هیالین بوده که به علت چندلایه بودن، آن را لایه مورق (Laminated layer) نیز می گویند. این لایه دارای سلولهای بدون هسته، به رنگ سفید و به ضخامت ۱mm بوده که وظیفه اش حفاظت از کیست در برابر نفوذ میکروبها بوده و همچنین نقل و انتقال مواد غذایی را به عهده دارد.

لایه داخلی یا غشای زایا: این لایه بسیار نازک، ظریف و به ضخامت ۵ میکرون بوده و دارای هسته های فراوان می باشد. از سطح داخلی آن جوانه هایی به سمت داخل رشد می کنند که به کپسول های زایا موسوم هستند. با توجه به اینکه جدار این کیست ها فقط از لایه زایا تشکیل شده و از سطح داخلی آن، پروتواسکولکس ها (۳ تا ۳۰ عدد) بوجود می آیند، به آن کپسول های زایا نیز می گویند. در داخل کیست اصلی (مادر)، کیست های

کوچکتری با ساختمان مشابه آن به وجود می آیند که به آنها کیست های دختر (Daughter cyst) می گویند. در درون این کیست ها، کپسول های زایا ایجاد می شوند. در درون هر کیست هیداتیک کامل، حدود ۲ میلیون پروتواسکولکس وجود دارد. با رشد بیشتر کیست، کپسول های زایا پاره شده و پروتواسکولکس ها به درون کیست آزاد می شوند. به مجموع کپسول های زایا و پروتواسکولکس های آزاد درون کیست اصلی، شن هیداتیک گفته می شود. پروتواسکولکس ها می توانند با خورده شدن توسط میزبان اصلی، به یک کرم بالغ تبدیل شوند. گاهی ممکن است لارو بدون سر یا پروتواسکولکس در بدن میزبان و کیست ها به وجود آید که به آنها کیست های استریل یا کیست های سترون (Acephalocyst) گفته می شود. یک لایه فیبری نیز اطراف کیست های متکامل تشکیل می شود که درحقیقت در اثر واکنش دفاعی میزبان در مراحل اولیه پس از تشکیل کیست می باشد. این لایه به عنوان اولین لایه تشکیل شده پس از رشد اولیه انکوسفر، مهمترین نقش در شکل گیری کیست را خواهد داشت. چنانچه اگر واکنش دفاعی میزبان بر علیه کیست شدید باشد، اصولاً کیستی تشکیل نخواهد شد. مایع کیست هیداتیک، مایعی صاف، شفاف و با وزن مخصوص ۱۰۰۷ تا ۱۰۱۵ بوده و حاوی آلبومین، پروتئین، نمک، املاح فسفات، سولفات، سوکسینات، قند و یک ماده سمی است. در صورت پاره شدن کیست ممکن است واکنش آلرژیک در میزبان ایجاد شده و ممکن است باعث شوک آنافیلاکتیک و مرگ آن شود (۲۳-۲۱) (تصویر ۳).



تصویر ۳: ساختمان کیست هیداتیک

سیر تکاملی اکینوкокوس گرانولوزوس:

اکینوкокوس گرانولوزوس همانند سایر اعضای خانواده تنیده آ، به دو میزبان پستاندار (میزبان نهایی و میزبان واسط) برای تکمیل چرخه زندگی خود نیاز دارد. محل جایگزینی انگل بالغ، روده میزبان نهایی می باشد. به طور کلی میزبانان نهایی اکینوкокوس گرانولوزوس در دنیا عمدتاً از خانواده سگ سانان می باشند. کرم بالغ این انگل علاوه بر سگ ها، از گرگ، شغال زرد و روباه قرمز نیز جدا شده است.

مرحله لاروی انگل (متاستود یا کیست هیداتید)، در ارگان های داخلی میزبان های واسط رشد می کنند. میزبان های واسط عمدتاً علفخواران هستند، هرچند انسان و میمون نیز به راحتی آلوده می شوند. کیست هیداتید علاوه بر گوسفند، بز، گاو و شتر از گوسفند وحشی، آهو، خوک، الاغ و گراز نیز گزارش شده است.

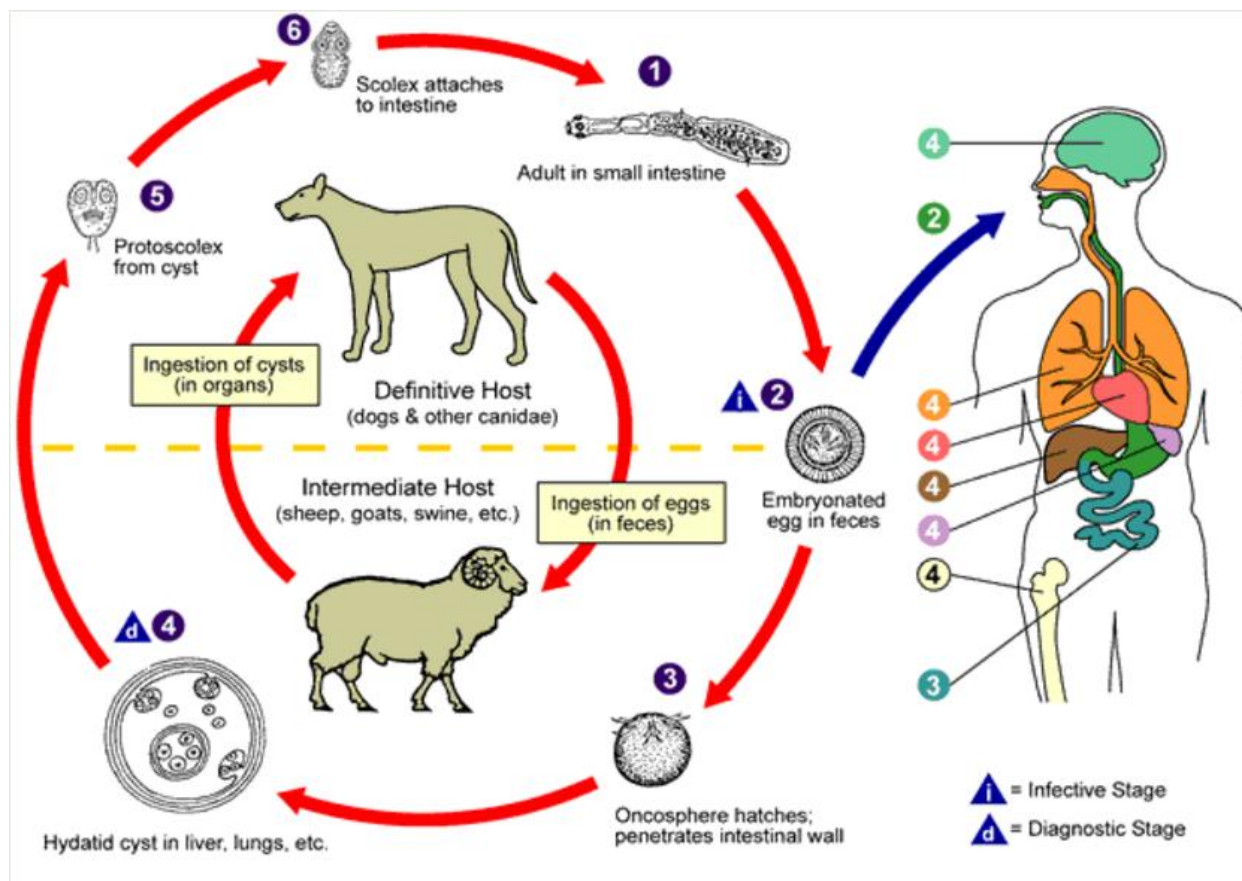
میزبان های نهایی، با تغذیه از اندامهای آلوده به کیست هیداتید موجود در میزبان های واسط، به انگل مبتلا می شوند. در هر کیست ممکن است هزاران پروتواسکولکس وجود داشته باشد، که هر یک می تواند به یک کرم بالغ تبدیل شود. پروتواسکولکس ها پس از تماس با آنزیم ها و سایر فاکتورهای موجود در روده کوچک میزبان نهایی، فعال شده و برای جلوگیری از دفع از روده، به سرعت به کریپت های روده متصل می شوند و طی ۴-۵ هفته به کرم بالغ تبدیل می شوند. اصولاً انگل در حال رشد، توسط بادکش ها محکم به بافت های میزبان متصل شده و قلاب ها به صورت سطحی به اپی تلیوم مخاط نفوذ می کنند و مانند لنگر از دفع انگل پیشگیری می کنند. مراحل رشد انگل در میزبان های نهایی، اساساً برای تمام گونه های اکینوкокوس یکسان بوده ولی سرعت رشد، به خصوص در ارتباط با رشد و شروع تولید تخم، متفاوت است. در روند بلوغ کرم، دستگاه تولید مثل اولیه معمولاً حدود روز یازدهم پس از آلودگی، ظاهر و تا روز چهاردهم، اولین بند به وضوح مشاهده می شود. مراحل بعدی رشد ونمو اکینوкокوس، از الگوی عمومی سستوها تبعیت می کند. اکینوкокوس یک انگل هرمافرودیت و قادر به خود لقاحی بوده و شروع تولید تخم، در بین گونه ها و نیز سویه ها متفاوت است که این مدت در اکینوкокوس گرانولوزوس حدود ۵۸ - ۳۴ روز می باشد. در هر بند بارور ممکن است تا ۱۵۰۰ تخم تولید شود که بند های مذکور همراه با مدفوع میزبان نهایی به خارج دفع شده و برای میزبان واسط، آلوده کننده هستند.

به دنبال بلع تخم توسط میزبان واسط، انکوسفر از تخم آزاد شده و تحت تاثیر آنزیم های پروتئولیتیک مثل پپسین، پانکراتین و نمک های صفراوی فعال می شود. مطالعات تجربی در حیوانات نشان داده اند که انکوسفر اکینوкокوس گرانولوزوس به ویلی های ژوژنوم و ابتدای ایلئوم نفوذ می کند. نفوذ جنین باحرکت قلاب ها و پیکره انجام شده و احتمالاً با ترشحات انکوسفر که باعث تحریک بافت میزبان می شود، تقویت می گردد. پس از

نفوذ، انگل وارد گردش خون شده و توسط جریان خون ورید باب به کبد رفته و پس از گذشتن از فیلتر کبدی یا از طریق عروق لنفاوی، به قلب راست رفته و سپس وارد گردش خون کوچک می شود. اگر انکوسفر مجدداً از فیلتر ریه بگذرد و وارد جریان خون عمومی شود عملاً می تواند به هر عضوی از بدن به ویژه اعضای دارای عروق بزرگتر حمل و در آنجا ساکن شود. پس از یک دوره زمانی نامعین و به محض یافتن مکانی برای استقرار، مراحل رشد انکوسفر آغاز می شود و به شکل گیری متاستود می انجامد. انکوسفر در عرض دو هفته، سازماندهی های مجددی انجام می دهد که شامل تکثیر سلولی، از بین رفتن قلاب های انکوسفر، آتروفی عضلات، وزیکولر شدن، تشکیل حفره مرکزی و رشد لایه های زایا و مطبق است. حفره کیست با مایعی شفاف، بی رنگ و استریل پر می شود. عواملی که استقرار نهایی متاستود اکینوکوکوس را تعیین می کنند روشن نیستند، اما احتمالاً ویژگی های آناتومیک و فیزیولوژیک و نیز گونه و سویه انگل و میزبان در این امر دخیل باشند. در بیشتر بیماران (۸۰-۴۰ درصد) کیست در یک عضو ایجاد می شود. اولین عضو درگیر در ۷۰ درصد بیماران، کبد بوده و دومین عضو درگیر، ریه (۲۰ درصد) می باشد. و سایر اعضا کمتر از ۱۰ درصد، کیست را در خود جای می دهند.

رشد کیست ها به کندی و در طی یک دوره چند ساله صورت می گیرد و بسته به عوامل متعدد از جمله گونه انگل، گونه میزبان و شدت عفونت متغیر است. رشد سالانه کیست ها، در حدود ۵-۱ سانتیمتر بوده و در انسان ممکن است این رشد بیشتر باشد و یا از نظر اندازه تا ده ها سال بدون تغییرات محسوسی باقی بماند. بعضی کیست ها ممکن است خودبخود پاره و ناپدید شوند. در اثر پارگی خودبخودی، ناشی از ضربه، و اعمال جراحی و نشت محتویات کیست، ممکن است عفونت ثانویه ایجاد شود، ایجاد کپسول زایا ممکن است از چند ماه تا چند سال طول بکشد و در انسان و سایر میزبانان غیر اختصاصی ممکن است هیچ گاه رخ ندهد.

ایجاد کپسول های زایا و پروتواسکولکس ها ربطی به اندازه کیست ندارد و به نظر می رسد که وابسته به ارتباط میزبان - انگل باشد. طول عمر کیست های ناشی از اکینوکوکوس در انسان، تا ۵۱ سال نیز گزارش شده است (۲۶-۲۴) (تصویر ۴).



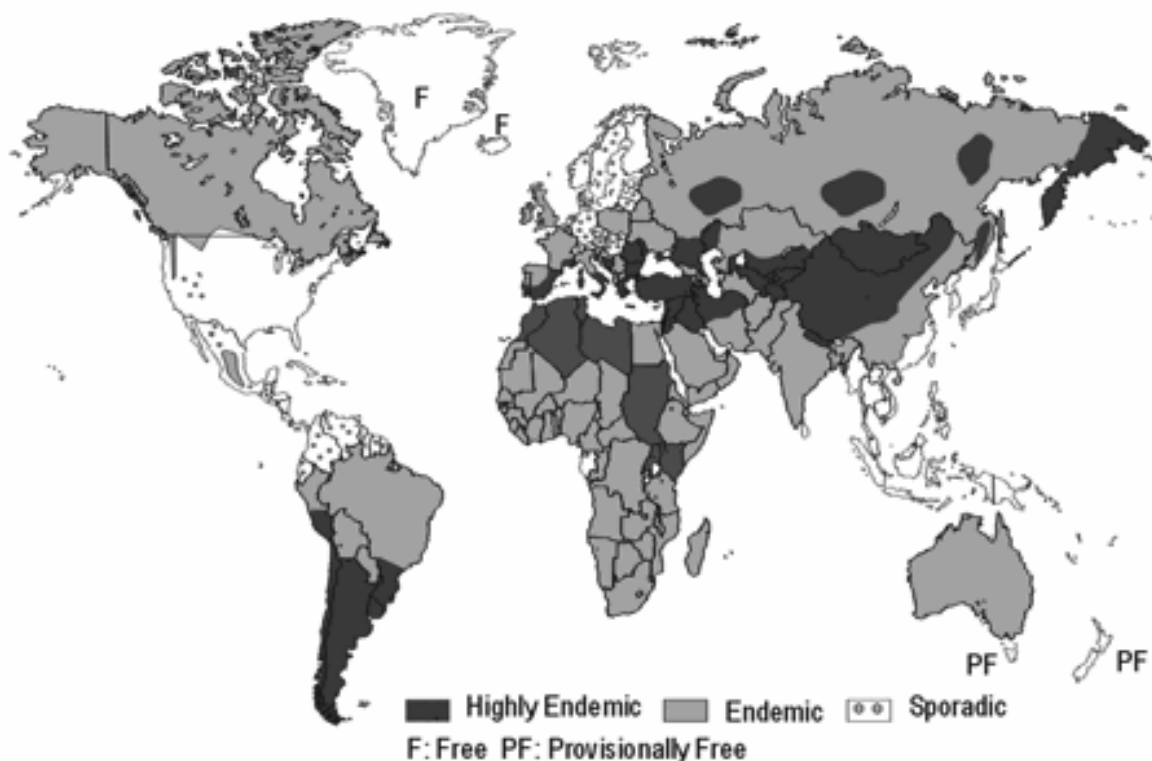
تصویر ۴: جرخه زندگی اکینوкокوس گرانولوزوس

انتشار جغرافیایی و شیوع اکینوکوکوس و هیداتیدوز در نقاط مختلف کره زمین:

هیداتیدوز دارای گستردگی جغرافیایی جهانی بوده و از تمامی قاره های جهان و مناطق سرد، معتدل، نیمه گرمسیری و گرمسیری گزارش شده است. آلودگی با گونه های اکینوکوکوس نه فقط در کشورهای در حال رشد بلکه در کشورهای صنعتی به ویژه در نواحی روستایی نیز شایع بوده و انتشار گسترده انگل، به میزان زیادی به پرورش سنتی دام ها مربوط می باشد. تفاوت های منطقه ای در میزان شیوع و الگوی انتقال انگل را، عوامل متعددی از جمله میزبان، محیط و رفتارهای انسانی تعیین می کنند. ویژگی های اقتصادی-اجتماعی و فرهنگی از مهمترین عوامل آلودگی انسان محسوب می شوند. در بعضی نواحی که بارندگی کافی بوده و فرهنگ کشاورزی حاکم است و حیوانات با آداب و رسوم کشاورزی پرورش یافته و پرورش انبوه دام، تحت نظارت دقیق می باشد، اکینوکوکوزیس معمولاً نادر است (۲۷). اکینوکوکوزیس کیستیک در اکثر کشورهای شمال آفریقا از جمله الجزایر، مصر، لیبی، مراکو، تونس، و همچنین در بعضی از کشورهای آفریقایی دیگر از جمله اتیوپی، کنیا، موریتانی، سودان، و تانزانیا هیپر اندمیک بوده (۳۰-۲۸) و از بیشتر کشورهای غربی، مرکزی و جنوبی آفریقا گزارش شده است (۳۱). در چرخه اهلی این انگل در مناطق مذکور، سگ به عنوان میزبان قطعی و گوسفند، بز، گاو، اسب، شتر و خوک به عنوان میزبانان واسط مطرح هستند. در چرخه وحشی انگل مذکور، شغال، کفتار، سگ وحشی، روباه و شیر به عنوان میزبان های قطعی و نهایی و تعداد زیادی از سم داران از جمله گوزن و کرگدن، به عنوان میزبان های واسط انگل شناخته شده اند (۳۲). بیماری در بسیاری از مناطق آسیایی از جمله کشورهای ایران، عراق، پاکستان، عربستان سعودی و همچنین آسیای مرکزی (قزاقستان، قرقیزستان، تاجیکستان، ترکمنستان و ازبکستان)، چین، هند و ژاپن شایع بوده (۳۵-۳۳) و در بعضی نواحی شرق مدیترانه، خلیج فارس و کشور های جنوب شرق آسیا حائز اهمیت می باشد (۲۷، ۳۶، ۳۷). در آسیا عمدتاً سگ به عنوان میزبان قطعی و گوسفند، بز، گاو، بوفالو، شتر، خوک و گاومیش به عنوان میزبان واسط مطرح هستند. گوشتخواران وحشی از جمله شغال، گرگ و روباه قرمز نیز به عنوان میزبان اصلی در مناطق مذکور ایفای نقش می کنند (۱، ۳۸، ۳۹).

هیداتیدوز در بسیاری از کشور های اروپایی از جمله روسیه، اسپانیا، ایتالیا، یونان، بلغارستان، رومانی و ترکیه گزارش شده ولی در انگلستان، اروپای مرکزی، ایالات بالتیک و کشورهای اسکاندیناوی کمتر دیده شده است (۲۸، ۳۱، ۴۰). همانند دیگر مناطق جهان، در اروپا نیز سگ به عنوان میزبان نهایی، و علفخواران اهلی (گوسفند، بز، گاو، بوفالو، اسب و خوک) به عنوان میزبانهای واسط می باشند. در چرخه وحشی نیز، گوشتخواران وحشی (گرگ، روباه و شغال) و گراز وحشی به ترتیب به عنوان میزبان های اصلی و واسط مطرح هستند (۲۷).

اکینوкокوزیس کیستیک در کشورهای آمریکای جنوبی از جمله آرژانتین، برزیل، شیلی، پرو و اروگوئه هایپراندیمیک می باشد. در کشورهای مذکور سگ به عنوان میزبان قطعی و نهایی و گوسفند، بز، گاو، اسب، خوک، و آلیاکا (نوعی شتر)، به عنوان میزبان های واسط مطرح هستند. به نظر می رسد این بیماری در کشورهای شمال غربی امریکای جنوبی و امریکای مرکزی نادر باشد (۴۱). این انگل در کالیفرنیا، یوتا، آریزونا و نیومکزیکو به صورت اسپورادیک گزارش شده است (۲۳، ۴۲). در مناطق شمالی قاره آمریکا (کانادا و آلاسکا)، چرخه وحشی انگل در گرگ و انواعی از گوزن ها اتفاق می افتد (۴۱). در استرالیا، این انگل دارای اهمیت بوده و به عنوان یک مشکل بهداشتی شناخته می شود. فرم وحشی این انگل در یک سگ استرالیایی و کانگوروی قرمز دیده شده است. در برخی از کشور های پیشرفته در اثر برنامه ریزی های کنترلی موفقیت آمیز، انتشار بیماری کاهش یافته به طوری که در ایسلند، نیوزلند، تاسمانیا، و جنوب قبرس انگل ریشه کن شده است (۴۳) (تصویر ۵).



تصویر ۵: پراکندگی اکینوکوکوس گرانولوزوس در جهان

انتشار جغرافیایی و شیوع اکینوکوکوس و هیداتیدوز در ایران :

ایران یکی از کانون های اندمیک انگل بوده و از اکثر استان های کشور گزارش شده است (۴۴). در ایران تاکنون دو گونه اکینوکوکوس گرانولوزوس و اکینوکوکوس مولتی لوکولاریس گزارش شده که اکینوکوکوس گرانولوزوس از لحاظ اپیدمیولوژیکی و بیماریزایی بیشتر مورد اهمیت می باشد. گونه اکینوکوکوس مولتی لوکولاریس اکثرا به صورت چرخه وحشی در ناحیه دشت مغان و بین گوشتخواران وحشی و جوندگان مشاهده شده است (۴۵). اکینوکوکوس گرانولوزوس در ایران سه سیکل تکاملی مشخص دارد: سیکل اهلی بین سگ و علفخواران اهلی (گوسفند و بز)، سیکل بیابانی بین سگ و شتر، و سیکل وحشی بین گوشتخواران و علفخواران وحشی (۴۴). شیوع اکینوکوکوس گرانولوزوس در ایران از ۵/۱٪ تا ۷۴/۴٪ در گوسفندان، ۱/۷٪ تا ۲۰٪ در بز ها، ۳/۵٪ تا ۳۸/۳٪ در گاوها و ۱۱/۴٪ تا ۷۰٪ در شتر ها گزارش شده است (۴۶، ۴۷). به طور کلی بر اساس مطالعات

کشتارگاهی، ۷ درصد از دام ها به کیست هیداتید آلوده هستند. بالاترین و پایین ترین میزان آلودگی به ترتیب از اردبیل و قم گزارش شده است. آلودگی در سگ ها از مناطق مختلف گزارش شده، چنانکه در سگهای گله، حداکثر و حداقل آلودگی ۶۳/۳ درصد و ۳/۳ درصد به ترتیب از استانهای اصفهان و سیستان و بلوچستان گزارش شده است (۴۷). دلیمی و همکاران در سال ۲۰۰۶ با بررسی ۱۱۵ سگ ولگرد، ۸۶ شغال، ۶۰ روباه و سه گرگ نشان دادند که ۱۹/۱٪ سگ ها، ۱۰/۳٪ شغال ها و ۵٪ روباه ها آلوده به اکینوкокوس گرانولوزوس بودند. شیوع عفونت در حیوانات وحشی در استان های غربی در مقایسه با شمال ایران کمتر گزارش شده که این مسئله می تواند ناشی از موقعیت متفاوت جغرافیایی دو منطقه مذکور باشد. در غرب به دلیل موقعیت کوهستانی، جمعیت گوشتخواران وحشی به مراتب کمتر از شمال ایران است و حیوانات غالباً دور از زیستگاه انسانها و در مناطق کوهستانی زندگی می کنند. بنابراین در غرب کشور شغال زرد و روباه قرمز نقش مهمی در اپیدمیولوژی اکینوкокوسیزیس ندارند، در صورتیکه در شمال کشور، جمعیت زیادی از شغالهای زرد و روباههای قرمز که در نزدیک زیست گاههای انسان زندگی می کنند، در اثر تغذیه از امعاء و احشاء دامهایی که به روش غیر استاندارد ذبح می شوند آلوده می گردند. همچنین مطالعات در غرب کشور نشان داد که ۱۱/۳٪ گوسفندها، ۶/۳٪ گاوها و ۱۲/۴٪ گاو میش ها آلوده به این کیست بودند. میزان باروری کیست های کبدی در گوسفندان، بزها، گاوها و گاو میش ها، به ترتیب ۳۶/۹٪، ۲۰/۵٪، ۱۰/۲٪ و ۲/۹٪ گزارش شده است (۴۸). طی بررسی های انجام شده بر روی نشخوارکنندگان کشتار شده در شهرستان بانه (استان کردستان) در سال ۱۳۸۰، میزان شیوع هیداتیدوز در بین دامها، در گاو ۵/۶۹ درصد، گوسفند ۵/۲ درصد و بز ۱/۱۵ درصد گزارش گردید. کبد در ۱/۳۵ درصد گاوها، ۲/۳۱ درصد گوسفندان و ۰/۴۶ درصد بزها و ریه در ۳/۸ درصد گاوها، ۲/۳۱ درصد گوسفندها و ۰/۷ درصد بزها آلوده به کیست هیداتید بودند. همچنین آلودگی کبد - ریه در گاو و گوسفند به ترتیب ۰/۴ و ۰/۰۲ درصد و آلودگی قلب و طحال در گاو به ترتیب ۰/۰۲ و ۰/۱۲ درصد مشاهده شد (۴۹). کیست هیداتیک در شتر های پنج استان کشور مشاهده شده که بالاترین میزان عفونت از استان اصفهان (۵۹/۳٪) و کمترین میزان، از استان کرمان (۲۵/۷٪) گزارش شده است (۴۴).

آلودگی انسان به بیماری هیداتیدوز از نقاط مختلف ایران گزارش شده است. بررسی های انجام شده نشان می دهد به ازای هر ۱۰۰ هزار نفر، ۱/۱۲ نفر مبتلا به کیست هیداتید می باشند. بالاترین میزان آلودگی به کیست هیداتید انسانی، از استان خراسان (۴/۴۵ نفر به ازای هر صد هزار نفر) و کمترین میزان آلودگی از استان هرمزگان (۰/۱ نفر به ازای هر صد هزار نفر) گزارش شده است (۵۰). میزان آلودگی در انسان، در مناطق مختلف ایران و با استفاده از تست های تشخیصی سرولوژیک، بیشتر برآورد شده، چنانکه محققین، این آلودگی را بین ۱/۲ تا ۲۱/۴ درصد گزارش کرده اند (۴۷). طی بررسی های انجام شده در بیماران مبتلا به کیست هیداتید در بیمارستانهای شهر قم طی سالهای ۱۳۸۳ تا ۱۳۸۶، از تعداد ۱۹ بیمار، ۱۲ نفر (۶۳/۲ درصد) مونث و ۷ نفر (۳۶/۸ درصد) مذکر بودند و بیشترین فراوانی آلودگی (۳۱/۶۵ درصد) در گروه سنی ۲۱-۳۰ سال مشاهده شد (۵۱). همچنین در بررسی بیماری هیداتیدوز در تهران و در جمعیت مراجعه کننده به سازمان انتقال خون این شهر، میزان ۱/۶۳٪ افراد مراجعه کننده، آلوده به کیست هیداتید بودند، که این مسئله هشدار برای مراعات مسائل بهداشتی در شهر تهران می باشد (۵۲). هیداتیدوز یک بیماری شغلی محسوب می شود و اکثریت افراد را زنان خانه دار و کشاورزان تشکیل می دهند. در ایران هیداتیدوز مسئول تقریباً ۱٪ موارد جراحی در بیمارستان ها می باشد (۵۳، ۵۴). حداکثر میزان آلودگی در گروه سنی ۳۰-۲۵ سال دیده می شود اما مواردی در کودکان کمتر از ۵ سال و افراد بالاتر از ۸۰ نیز گزارش شده است (۵۵).

پاتوزنز و علائم بالینی هیداتیدوز :

علائم بالینی بیماری با توجه به محل درگیری، اندازه و شرایط کیست ها متفاوت بوده و میزان رشد کیست ها از ۱ تا ۵ سانتی متر در سال متغیر می باشد. رشد آهسته کیست ها اغلب به خوبی تحمل شده ولی در مراحل بعدی به علت بزرگی اندازه، می تواند باعث اختلال عملکردی عضو شود. بیشتر عفونتهای اولیه انسانی شامل یک کیست منفرد بوده ولی در ۲۰ تا ۴۰٪ موارد، افراد می توانند چند کیست یا چند عضو مبتلا به کیست داشته باشند (۲۱، ۵۶). کبد شایعترین محل درگیری با کیست بوده و در مرتبه بعدی ریه قرار دارد. با فراوانی

کمتری کیست ها ممکن است در طحال، قلب، استخوان و سیستم اعصاب مرکزی دیده شوند. کیست های کبدی ممکن است عمقی یا سطحی بوده و سبب فشردگی سلول های کبدی شوند، که می توانند منجر به استاز و کولانژیت صفراوی شوند. حدود ۳٪ از کیست های هیداتید، در مغز یا نخاع تشکیل می شوند که معمولا کیست های مذکور کوچک بوده و علائم آنها زودتر از کیست های اندامهای دیگر بروز می کنند. بیشتر کیست های مغزی در ماده سفید قرار دارند و به وسیله یک لایه نازک اکتسابی محاصره می شوند. رشد کیست های کلیوی و پانکراس معمولا آرام و بی سروصدا بوده ولی کیست های طحالی اغلب، قابل لمس هستند و می توانند سبب درد و ناراحتی در یک چهارم فوقانی سمت چپ شوند. علائم اکینوکوکوزیس کبدی می تواند شامل بزرگی کبد، درد اپی گاستریک راست، تهوع و استفراغ باشد. پاره شدن کیست ها و آزاد شدن ناگهانی محتویات آنها می تواند باعث ایجاد واکنش آلرژیک خفیف تا آنافیلاکسی کشنده نماید. در ریه ها، غشای کیست های پاره شده می تواند به طور کامل از طریق برونشها خارج شده و یا به عنوان کانون عفونی عمل نمایند (۲۱، ۵۷).

۷۵ درصد از کیست های بزرگ ریوی، در مراحل اولیه بدون علامت می باشند و به ندرت باعث درد قفسه سینه یا سرفه می شوند که ممکن است منجر به علائم برونکوپولموناری شوند (۵۵، ۵۸). کیست های ریوی همچنین می توانند باعث تخریب کامل لوب ریه شوند. ۲۵ درصد از کیست های ریوی پاره و عفونی شده و می توانند علائمی از قبیل درد قفسه سینه، سرفه، تب و خلط خونی ایجاد نمایند (۵۹، ۶۰).

روشهای تشخیص هیداتیدوز :

تشخیص به موقع بیماری هیداتیدوز می تواند منتهی به پیشرفت قابل توجهی در کنترل و درمان بیماری شود. اکینوکوکوزیس سیستمیک، تا ۶۵ درصد موارد، بدون علامت بوده و اغلب به دنبال تشخیص بیماری های دیگر کشف می شود.

تشخیص هیداتیدوز بر اساس اطلاعات زیر صورت می گیرد:

۱- یافته های بالینی، اطلاعات اپیدمیولوژیک و تاریخچه بیماری

۲- روش های تصویربرداری مثل سی تی اسکن، اولتراسونوگرافی، MRI، آنژیوگرافی، میلوگرافی و رادیوگرافی

۳- تست های آزمایشگاهی ایمونولوژیک شامل: جستجوی آنتی بادی ها، آنتی ژن ها، کمپلکس های ایمنی موجود در گردش خون، افزایش حساسیت تاخیری و سنجش افزایش لنفوسیت ها (۶۱).

۴- روش های پارازیتولوژیک

۵- روش های مولکولی

زندگی در مناطق اندمیک، شغل، سابقه اقامت در منطقه آلوده و نگهداری سگ از یافته های اپیدمیولوژیک و تاریخچه بیماری می باشد. در مناطق آلوده، تشخیص بیماری با بررسی سابقه تماس نزدیک بیمار با سگ، ملاحظه نشانه های بالینی و یافته های رادیوگرافی داده می شود. نشانه های یک عارضه توموری با رشد آهسته که با ائوزینوفیلی همراه باشد می تواند پزشک را به سمت تشخیص بیماری هدایت کند. در صورتی که کیست در محوطه شکمی قرار داشته و بزرگ باشد، برخی مواقع، می توان یک لرزش ویژه (hydatid thrill) در آن ناحیه را احساس کرد که علت آن را حرکت کیست های ثانویه در داخل کیست اصلی در موقع دق می دانند، ولی عفونت مذکور یک علامت ثابت و مشخص نمی باشد (۵۵). روش های تصویربرداری به طور کلی از روش های ایمونولوژیک حساس ترند، اما نیاز به تجهیزات مناسب دارند (۶۲، ۶۳). پرتونگاری با اشعه، ترجیحاً برای کیست های ریوی و یا کیست های آهکی شده در اعضای مختلف بدن استفاده می شود. کیست های ریوی به صورت توده های گرد و منظم با دانسیته یکنواخت مشخص می شود (۶۴). اولتراسونوگرافی و سی تی اسکن روش های انتخابی برای تشخیص کیست های کبدی و شکمی نظیر کیست های کلیوی، طحالی و یا حفره صفاقی می باشند. یافته های معمول در سونوگرافی، ضایعات کروی منفرد و یا چندگانه به قطر ۱ تا بیش از ۱۵ سانتی متر می باشد. تشخیص افتراقی از کیست های خوش خیم سروزی و آبسه مشکل می باشد. همچنین با

سونوگرافی و سی تی اسکن، تشخیص کیست های آهکی شده، پاره شده و یا جمع شده امکان پذیر می باشد. به طور کلی سونوگرافی دارای دقت بالایی در تشخیص بوده، به طوری که در دو مطالعه جداگانه میزان دقت این روش ۸۳ و ۹۳ درصد گزارش شده است (۶۵، ۶۶). سی تی اسکن می تواند کیست های کوچک به اندازه ۱ سانتی متر و بیشتر را کشف کند و توسط آن امکان بررسی در همه اعضای بدن وجود دارد. همچنین تشخیص افتراقی کیست های هیداتید از ضایعات غیر انگلی هم تا حدودی توسط روش مذکور امکان پذیر می باشد. سی تی اسکن در ارزیابی کیست ها و کمک به تصمیم گیری جراح برای جراحی و یا درمان موثر، نقش مهمی می تواند داشته باشد، ولی به دلیل بالا بودن هزینه انجام آزمایش سی تی اسکن، در بسیاری از مناطق دنیا عملاً امکان پذیر نمی باشد. MRI بیشتر برای تشخیص کیست های مغزی کاربرد دارد (۶۹-۶۷).

روش های سرولوژیکی:

آزمایشات مورد استفاده در تشخیص سرولوژیک کیست هیداتید متعدد بوده و عبارتند از:

۱- تست کازونی: در تشخیص کیست هیداتیک انسان با ارزش بوده و حساسیت آن معادل ۷۵ تا ۸۵ درصد گزارش شده است. در اشخاص غیر آلوده، نتایج مثبت کاذب تا حدود ۲۰ درصد مشاهده شده و پس از خارج کردن کیست با عمل جراحی یا مرگ و کالسیفیکاسیون کیست ها، واکنش ممکن است حداقل تا ۵ سال مثبت باقی بماند. برای انجام آزمون مذکور، ۰/۲ میلی لیتر از آنتی ژن مایع کیست را به صورت داخل جلدی در یک ساعد و معادل همین مقدار محلول سرم فیزیولوژی استریل، به عنوان شاهد، در ساعد مقابل تزریق می شود. برجستگی ناشی از تزریق محلول شاهد، معمولاً پس از چند دقیقه از بین می رود، در حالیکه اگر شخص مبتلا به بیماری باشد، محل تزریق آنتی ژن بعد از نیم ساعت قرمز و متورم می شود که تا یک ساعت به حداکثر مقدار خود می رسد و پس از آن به تدریج محو می شود. پاسخ ثانوی، به شکل یک منطقه اندوراسیون و قرمز رنگ با اندازه متفاوت و از نوع پاسخ های تاخیری بوده و در مدت ۲۴ ساعت حاصل می شود و ممکن است تا سه روز پایدار بماند. اکثر این نشانه ها شدید نیستند و نیاز به درمان ندارند. تفسیر نتایج آزمون پوستی در

مبتلایان به بیماری های آلرژیک باید با احتیاط صورت گیرد. آنتی ژن مورد نیاز برای آزمون کازونی از مایع درون کیست هیداتیک انسان یا حیوانات مختلف (گوسفند یا گاو) تهیه می شود (۵۵).

۲- تست آگلوتیناسیون لاتکس (Latex Agglutination): انجام این تست آسان و ارزان بوده و حساسیتی معادل ۱۰۰ درصد و ویژگی معادل ۷۴ درصد دارد (۷۰).

۳- الیزا (ELISA): حساسیت الیزا بیشتر از دیگر تست های سرولوژیکی بوده و امروزه به طور گسترده بیش از هر تست دیگر کاربرد داشته و اعتبار لازم و قابل قبولی جهت تشخیص هیداتیدوز انسانی دارد. در این آزمایش بسته به نیاز، آنتی ژن یا آنتی بادی روی چاهک های پلیت الیزا متصل شده و در نمونه های مورد نظر با استفاده از آنتی ژن یا آنتی بادی ثانویه که با آنزیم مخصوص (اوره آز، آلکالن فسفاتاز، بتاگالاکتوزیداز و Horserradish peroxidase) کونژوگه شده، دنبال مکمل آن می گردند. پس از شستشوی مجدد، سوبسترا اضافه شده و در نهایت رنگ ایجاد می شود که با استفاده از دستگاه ELISA Reader نتایج قرائت می گردد (۷۱).

۴- تست کانتر کارنت ایمونوالکتروفورزیس (Counter current immunoelectrophoresis): این تست بر روی ژل آگاروز جهت بررسی و اندازه گیری آنتی ژن Arc-5 انجام می شود که از دقت و سرعت بالایی برخوردار است (۷۲).

۵- تست های دابل - دیفیوژن و ایمونوالکتروفورزیس: هر دو روش، Arc-5 را شناسایی می کنند و به دلیل ارزانی و ویژگی نسبتاً زیاد بیشتر مورد استفاده قرار می گیرند. با توجه به اینکه روش های مذکور زیاد حساس نبوده و با سرم افراد مبتلا به سیتی سرکوزیس واکنش متقاطع دارند، لذا استفاده از آنها محدود می باشد. در تست های مذکور، هدف آشکار نمودن واکنش های آنتی ژن و آنتی بادی با استفاده از واکنش های رسوبی است که آنتی ژن و آنتی بادی به سمت یکدیگر حرکت کرده و با هم واکنش داده و ایجاد کمان رسوبی می کنند (۷۳-۷۵).

۶- تست ایمونوفلورسانس غیرمستقیم (Indirect Fluorescent Antibody Test): روش دیگری است که در آن از پروتواسکولکس های کیست های بارور به عنوان آنتی ژن استفاده می شود. این آزمون بسیار حساس و اختصاصی بوده و یک سال پس از جراحی موفقیت آمیز، منفی می شود (۷۶، ۵۵).

۷- تست هماگلوتیناسیون غیرمستقیم (Indirect Haemagglutination Test): این روش به آگلوتیناسیون اریتروسیت های پوشیده شده با آنتی ژن به وسیله آنتی بادی های موجود در سرم آزمون، بستگی دارد. IHA یکی از حساس ترین آزمایشات برای تشخیص هیداتیدوز محسوب می شود. از مزایای این روش تشخیص مقادیر کم آنتی بادی می باشد. اما به علت استفاده از آنتی ژن خام کیست هیداتید، واکنش متقاطع با سرم بیماران مبتلا به سایر بیماری های انگلی و غیر انگلی در آن دیده می شود (۷۷).

۸- تست کوآگلوتیناسیون (Coagglutination Test): این تست حساسیتی معادل ۵۰ درصد و ویژگی معادل ۸۹/۰۹ درصد دارد که یک تست آگلوتیناسیون غیرمستقیم است. در ابتدا جهت اندازه گیری آنتی ژن های آمیب به کار می رفت ولی بعدها در تشخیص کیست هیداتید و جهت اندازه گیری آنتی ژن ترشح شده از ادرار به کار گرفته شد (۷۸).

۹- EITB (Enzyme Linked Immunoelctrotransfer Blot):

از روش های حساس برای تشخیص هیداتیدوز بوده و کیست های کبدی را به خوبی تشخیص می دهد، اما در تشخیص کیست های ریوی حساسیت کمتری دارد. در مناطقی که هیداتیدوز و سیستی سرکوزیس اندمیک هستند، به دلیل حساسیت بیشتر و واکنش متقاطع کمتر، تست دابل دیفیوژن مناسب تر می باشد. EITB نیاز به تجهیزات مناسب و افراد خبره دارد، در نتیجه از تست دابل دیفیوژن که آسان تر است بیشتر استفاده می شود (۷۳).

۱۰- روش وسترن بلات (Western Blot): این روش عبارت است از انتقال باندهای پروتئین های الکتروفورز شده از روی ژل آکريل آميد، به روی يك غشاء (كاغذ نيترو سلولز). غالبا از آنتی بادی برای شناسایی آنتی ژن های اختصاصی استفاده می شود (۷۹).

۱۱- تست ثبوت مكمل (Complement Fixation Test): این روش در سال ۱۹۰۹ توسط Weinberg جهت تشخیص هیداتیدوز انسانی و حیوانی به كار گرفته شد. این تست در تشخیص و اندازه گیری آنتی بادی های مجهول و یا در اندازه گیری كمپلمان سرم بیمار بكار می رود. در این روش، از مایع کیست به عنوان آنتی ژن استفاده شده و به دليل موارد مثبت كاذب، دارای ویژگی پایینی بوده و امروزه کاربرد كمتری دارد (۵۵، ۸۰).

روش های تشخیص پارازیتولوژیک:

تشخیص مستقیم کیست ها به علت استقرار درونی آنها در داخل بدن و امکان پارگی آنها، مشکل است. با این وجود، دیدن لایه های کوتیکولی (laminated layer)، قلاب ها و اجسام آهکی در نمونه های خلط و نمونه های بیوپسی شده، می تواند در تشخیص كمك کننده باشد. بیوپسی توده های مشکوک به کیست هیداتید به علت پارگی، توصیه نمی شود. گاهی تحت مراقبت سونوگرافی با روش سوزن ظریف یا FAB (fine needle aspiration biopsy) بیوپسی انجام می گیرد. قطعات و لایه های کپسول زایا را با رنگ آمیزی پاس (periodic Acid shiff) می توان دید. اجسام آهکی (Calcareous bodies) به صورت شفاف و به اندازه ۵ میکرون که معمولا در داخل پروتواسکولکس ها قرار دارند مشاهده می گردند. همچنین دیدن پروتواسکولکس ها در زیر میکروسكوپ می تواند در تشخیص كمك کننده باشد (۸۱).

روش های تشخیصی مولکولی :

از روش های مولکولی از جمله PCR می توان برای تفکیک انگل های اکینوкокوس استفاده کرد. با استفاده از این تکنیک می توان با استفاده از پرایمر ها و پروب ها ی مختلف، تفاوت اکینوкокوس گرانولوزوس و ا. مولتی لوكولاریس را در نمونه های بالینی مشخص کرد (۸۲).

روش های درمانی هیداتیدوز :

جراحی:

درمان اصلی و انتخابی هیداتیدوز، جراحی و خارج کردن کیست ها می باشد. برای جلوگیری از متاستاز کیست ها، خارج کردن مایع کیست و جایگزینی آن با مواد پروتواسکولیسید از جمله فرمالین ده درصد، نیترا ت نقره ۰/۵ درصد و ... حیاتی است. باید توجه داشت که ترکیبات از بین برنده پروتواسکولکس ها بی خطر نبوده و باید زبان بار تلقی شوند. در شرایطی که کیست بزرگ و عفونی بوده و برداشت آن غیر ممکن باشد، عمل جراحی انتخابی مارسوپالیزاسیون (Marsupialization) است. در این روش، پس از استریل کردن کیست با تزریق فرمالین ۱۰ درصد، آن را به دیواره شکم می دوزند تا به تدریج با ایجاد گرانولاسیون ترمیم یابد.

روش PAIR (Puncture-Aspiration-Injection-Reaspiration):

در صورت وجود مهارت و امکانات کافی، به خصوص در مورد کیست های کبدی، می توان تحت هدایت سونوگرافی یا سی تی اسکن، به طریق جلدی، اقدام به آسپیراسیون محتویات کیست و تزریق محلول نمکی هایپرتونیک ۲۰ درصد یا دیگر محلول های کشنده اسکولکس و آسپیراسیون مجدد آن نمود.

درمان دارویی :

در سال های گذشته استفاده از مبندازول در درمان کیست هیداتیک افرادی که بیماری آنان غیر قابل عمل تشخیص داده شده بود (نظیر کیست هیداتیک استخوانی و کیست های متعدد مغز)، یا در ضمن عمل جراحی

کیست آنان پاره می شد، رایج گردید. از عوارض جانبی دارو، می توان به واکنش های آلرژیک، آلوپسی قابل برگشت، گلو مریولونفریت، اختلالات کبدی گذرا اشاره کرد. آلبندازول ترکیبی مشابه مبندازول است که در سال های اخیر در درمان کیست هیداتیک به کار رفته است. جذب گوارشی آلبندازول نسبت به مبندازول بهتر بوده و نفوذ بیشتری به داخل کیست های هیداتید دارد، بنابراین در حال حاضر عموماً بر مبندازول ترجیح داده می شود. تعیین دوره های درمانی به عواملی چون پاسخ بیمار به درمان، تعداد کیست ها، نوع و محل آن بستگی دارد. آلبندازول عموماً به میزان ۱۵ میلی گرم به ازاء هر کیلوگرم وزن بدن، برای ۴ هفته تجویز می شود. نتایج درمان را می توان به بهترین وجه توسط سونوگرافی یا MRI با تکرار در فواصل تقریباً ۳ ماهه بررسی نمود. پرازی کوانتل تا حدودی دارای اثرات نابود کننده بر پروتواسکولکس ها بوده و ترکیب آن با آلبندازول می تواند نتایج خوبی داشته باشد. تزریق مستقیم ایورمکتین به داخل کیست ها، در حیوانات آزمایشگاهی، می تواند در نابودی تمام پروتواسکولکس ها ایفای نقش کند (۵۵، ۸۳، ۸۴).

کنترل و پیشگیری :

با رعایت موازین بهداشتی، از جمله درمان سگ های آلوده، جلوگیری از تغذیه سگ ها با احشای حیوانات آلوده به کیست و کاهش تماس انسان با سگ می توان با این آلودگی انگلی مبارزه کرد. در مناطق اندمیک باید سگ های ولگرد را از بین برد. لاشه یا احشای آلوده به کیست حیوانات را باید سوزاند یا به نحوی دفن کرد که از دسترس سگ ها دور باشد. تهیه شناسنامه بهداشتی برای سگ های گله و خانگی، احداث کشتارگاه های بهداشتی در مناطق مختلف کشور، کاهش سن ذبح گوسفندان، داشتن اطلاعات لازم در مورد روش های انتقال انگل، آموزش افراد و رعایت نکات دیگر بهداشتی می تواند در کنترل بیماری هیداتیدوز دخیل باشد (۵۵).

چهار مرحله اساسی در یک برنامه موفق کنترلی وجود دارند که هر کدام از نظر هزینه، نیروی انسانی، تجهیزات و مدت زمان لازم متفاوت می باشند:

مرحله طراحی (Planning phase): در طول این مرحله، برای اتخاذ روش هایی که ممکن است بکار گرفته شود، مطالعاتی صورت می گیرد. این مطالعات بایستی جامع و در برگیرنده نکات مهم در زمینه های مختلف از جمله وسعت انتشار و انتقال انگل، میزبانهای انگل در منطقه، هزینه ها و زیانهای ناشی از انگل برای جامعه، پیش بینی نتایج و زمان لازم برای هر مرحله، فواید و هزینه های کنترل باشد.

مرحله حمله (Attack phase): این مرحله ممکن است هزینه زیادی لازم داشته باشد که بطور خلاصه می توان به هزینه های تربیت و آموزش پرسنل، حقوق کارمندان، آموزش همگانی، مراقبت و نظارت بر جمعیت میزبانهای واسط، مراقبت و درمان بیماری در انسان و ارزیابی نتایج اشاره کرد.

مرحله استحکام (Consolidation phase): در این مرحله، بر اصول زیر تاکید می شود: نظارت و بازرسی از دام های وارد به کشتارگاه، قرنطینه و مراقبت از لاشه های آلوده، نظارت دقیق بر رعایت موازین بهداشتی در کشتارگاه، شناسایی سگ های منطقه و درمان سگهایی که با لاشه های آلوده در تماس هستند.

نگهداری (Maintenance): این مرحله به مدت نامشخصی ادامه می یابد و در این مرحله، روش های به صرفه از نظر اقتصادی جهت حفظ وضعیت کنترل شده مورد استفاده قرار می گیرد (۲۵، ۸۵).

ایمونولوژی کیست هیداتید:

درباره فاکتورهای موثر بر مقاومت طبیعی نسبت به عفونت با اکینوкокوس گرانولوزوس اطلاعات کمی وجود دارد. شایان توجه است که در گاوها با وجود حساسیت طبیعی به عفونت، کیست ها اکثرا غیر بارور بوده و کپسول زایا و پروتواسکولکس تولید نمی کنند، در صورتیکه کیست ها در گوسفندان بطور کامل بارور می باشند. برای توجیه مسئله فوق باید گفت، ممکن است گاوها از ایمنی طبیعی برخوردار باشند که از رشد و تکامل پروتواسکولکس ها ممانعت می کنند و برعکس به نظر می رسد که گوسفندان به شدت به عفونت حساس بوده و مقاومت محدودی به عفونت اولیه دارند. در عفونت تجربی ثانویه در موش، پروتواسکولکس هایی که به صفاق

موش تلقیح می شوند در عرض ۳ روز توسط انفیلتراسیون سلولی (ماکروفاژهای فعال، نوتروفیل ها، ائوزینوفیل ها و لنفوسیت ها) احاطه می شوند. میزان بالای فاکتور نکروز دهنده تومور (TNF)، اینترفرون گاما، اینترلوکین ۶ و IgG₁ اختصاصی در سرم قابل ردیابی بوده و در حفره صفاقی قابل شناسایی هستند (۸۶).

مهمترین آنتی ژن های غالب در کیست هیداتید، آنتی ژن B (AgB) و آنتی ژن ۵ می باشند. AgB موجود در مایع کیست هیداتید، نقش مهمی در تحریک پاسخ های ایمنی ایفا می کند. این آنتی ژن یک نوع لیپوپروتئین مقاوم به حرارت بوده و از ۳ زیر واحد ۱۲، ۱۶ و ۲۰ کیلودالتونی تشکیل شده است، به طوریکه زیر واحد ۲۰ kDa باعث القا پاسخ های ایمنی می شود. در مقابل، آنتی ژن ۵ یک نوع لیپوپروتئین حساس به حرارت بوده و از دو زیر واحد ۵۵ و ۶۵ کیلودالتونی تشکیل شده و زیر واحد ۵۵ kDa می تواند باعث ایجاد پاسخ های ایمنی شود (۸۷). پاسخ های ایمنی بر علیه کیست هیداتید می تواند بصورت پاسخ های ایمنی ذاتی (اولیه یا غیر اختصاصی) و پاسخ های ایمنی اکتسابی (ثانویه یا اختصاصی) باشد.

پاسخ های ایمنی ذاتی بر علیه کیست:

ایمنی ذاتی بر علیه کیست هیداتید و لایه های آن بالاخص لایه های ژرمینال به عنوان یکی از مکانیسم های احتمالی در سرکوب کیست هیداتید محسوب می شود (۱۰). اجزای مهم سلولی ایمنی ذاتی، نوتروفیل ها، ماکروفاژها، ائوزینوفیل ها، فیبروبلاست ها و جز پنجم آلترناتیو کمپلمان می باشند. سیستم کمپلمان با فعال شدن توسط سیستم ایمنی همورال می تواند بر علیه انگل وارد عمل شود. پروتواسکولکس های اکینووکوکوس گرانولوزوس قادرند سیستم کمپلمان را حتی در نبود آنتی بادی فعال کنند. مایع هیداتید خام و فیلتر نشده از تأثیر لیزکنندگی سرم تازه روی پروتواسکولکس ها جلوگیری می کند و شاید به همین دلیل است که در داخل کیست علیرغم وجود کمپلمان در مایع، پروتواسکولکس ها کماکان زنده و فعال باقی می مانند. در مایع کیست هیداتید، فاکتورهایی وجود دارد که با کمپلمان سرم وارد عمل شده و C3 را مصرف می کند و در نهایت با ایجاد ترکیبات آنافیلاتوکسینی سبب بروز شوک آنافیلاکسی در هنگام پاره شدن کیست می گردند (۸۸). علاوه بر

این پدیده آپوپتوزیس نیز به عنوان ایمنی ذاتی مطرح شده است که به عنوان یکی از مکانیسم های مهم دفاعی در برابر عوامل بیماریزا محسوب می شود (۸۹، ۱۱).

پاسخ ایمنی اکتسابی علیه کیست:

این پاسخ ها از طریق دو مسیر با عوامل بیگانه مقابله می کنند:

الف) تعدیل در تمایز مونوسیت های مایع کیست هیداتید به سمت سلول های دندرتیک:

سلول های دندرتیک به عنوان سلول های عرضه کننده آنتی ژن حرفه ای (APC) بوده و می توانند باعث تحریک لنفوسیت ها و ترشح سایتوکاین ها از لنفوسیت های TH1 و TH2 شوند. سلول های دندرتیک مهم ترین سلول های عرضه کننده آنتی ژن می باشند که به صورت کاملاً حرفه ای عمل می کنند به طوری که توانائی فعال کردن لنفوسیت های دست نخورده (Naive Tcell) در اندام های لنفاوی ثانویه (طحال، مغز، استخوان و گره های لنفاوی) را دارند (۹۰). لنفوسیت های TH1، با تولید سایتوکاین های اینترفرون گاما (به عنوان تحریک کننده ماکروفاژ)، TNF- β (Tumor Necrosis Factor- β) و IL2 در ایمنی سلولار نقش دارند. لنفوسیت های TH2 نیز با همکاری B cell ها در ازدیاد حساست زودرس (مثل شوک آنافیلاتیک در کیست هیداتید) تیپ ۱ تا ۳ و با تولید IL13، IL10، IL5 و IL4 در ایمنی هومورال نقش دارند که IL5 به عنوان غالب ترین اینترلوکین در هیداتیدوز مطرح شده است.

در عفونت های اولیه بیماری هیداتیدوز (۳ ماه اول)، سلول های TH1 و TH0 و در عفونت های ثانویه، سلول های TH2 افزایش می یابند. به طوریکه که در عفونت های اولیه، اینترفرون گاما، فاکتور نکروز دهنده تومور آلفا (TNF α) و ایمنوگلوبولین های IgG1 و IgG3 افزایش یافته و در عفونت های ثانویه IL10، IL13، IL4 و IL5 و همچنین ایمنوگلوبولین های Ig G4 و IgE بالا می روند (۹۱).

(ب) تولید ایمنوگلوبولین ها:

۴ ماه پس از بلعیدن تخم انگل توسط گوسفند، ایمنی همورال و تولید آنتی بادی علیه شاخص های آنتی ژنیک انگل رخ می دهد. آنتی بادی های اختصاصی از کلاس های IgG, IgM, IgA و IgE تولید می شوند ولی کلاس غالب IgG می باشد. آنتی بادی های اختصاصی علیه آنتی ژن های این انگل تا چند سال پس از بهبود باقی می ماندند (۸۶). IL4 مترشح از لنفوسیت های TH2 باعث تغییر کلاس آنتی بادی ها به IgE و IgG4 در انسان و IgG1 در موش شده و سبب تمایز سلولهای TH0 به TH2 می شود، درحالیکه از تمایز این سلول ها به TH1 ممانعت به عمل می آورد. IL5 نیز عامل تحریک در تولید و فعالیت ائوزینوفیل ها بوده و سلول های مذکور به دلیل داشتن پروتئین MBP (Major Basic Protein) موجود در گرانول های خود می توانند باعث از بین بردن انگل ها شوند. این پروتئین یک ماده سیتوتوکسیک برای کرم ها محسوب شده و باعث آزاد سازی هیستامین از بازوفیل ها می شود. همچنین IL5 قادر به تقویت بازوفیل ها جهت آزاد سازی محتویات گرانولی خود می باشد. در نهایت در بیماری های انگلی و آلرژیک میزان این دو ایمنوگلوبولین (IgE و IgG4) در سرم افزایش یافته و با ازدیاد ائوزینوفیل ها و ماست سل ها در خون و بافت مواجه هستیم (۹۲).

با توجه به گزارشات مختلف، کیست های هیداتید در انسان می توانند تا ۵۳ سال زنده بمانند. توانایی بقای انگل برای چنین مدت زمان طولانی در میزبان ها، حاکی از استراتژی های مختلف انگل برای زنده ماندن و فرار از پاسخ محافظتی میزبان می باشد. چنانکه از لحاظ نظری، کیست هیداتید برای بی اثر کردن پاسخ ایمنی میزبان، با دو مکانیسم فرار غیر فعال و تعدیل پاسخ ایمنی میزبان، می تواند ایفای نقش کند. در فرار غیر فعال، انگل از اثرات تخریبی پاسخ ایمنی دوری می کند و برای تعدیل پاسخ ایمنی، انگل فعالانه با سیستم ایمنی بدن برای کاهش برخورد پاسخ ایمنی با انگل مقابله می کند. نکته قابل توجه در کیست هیداتید، ایجاد دو کپسول در اطراف آن می باشد که یکی کپسول بدون سلول (لایه مطبق) بوده که توسط کیست ایجاد شده و لایه دیگر، کپسول فیبروزه می باشد که توسط میزبان ترشح و کیست را کاملاً در بر می گیرد که این عمل احتمالاً با

فیلتراسیون اتوزینوفیل ها، فیبروبلاست ها و سلول های مزوتلیال شکل می گیرد. این ساختمان، انگل را از حمله فیزیکی و پاسخ ایمنی میزبان محافظت می کند (۹۳، ۹۴).

آپوپتوزیس

واژه آپوپتوز برای اولین بار در سال ۱۹۷۲ میلادی توسط محققى به نام Kerr جهت توصیف مرگ فیزیولوژیک سلولی بر اساس تغییرات مورفولوژیکی و تمایز آن از نکروز معرفی شد. آپوپتوز یک کلمه یونانی است و به معنی برگ ریزان می باشد و اغلب منابع دو واژه آپوپتوز و مرگ برنامه ریزی شده سلول را مترادف هم به کار برده اند و عده ای دیگر نیز آپوپتوز را مهمترین نوع مرگ برنامه ریزی شده سلولی قلمداد کرده اند. این محققان مرگ برنامه ریزی شده سلولی را به صورت یک عنوان کلی جهت بیان و توصیف مرگ فیزیولوژیک سلولی به کار برده و آن را برحسب عامل ایجاد کننده مرگ سلولی، مکانیسم عمل، تغییرات مورفولوژیک و بیوشیمیایی به دو نوع مرگ برنامه ریزی شده آپوپتوزی و مرگ برنامه ریزی شده غیر آپوپتوزی تقسیم بندی می نمایند.

آپوپتوز مرگ فیزیولوژیک سلولی است که در شرایط طبیعی سبب حذف سلولهای پیر، آسیب دیده، اضافی و مضر می شود و برای تکامل و هموستاز بافتی ضروری می باشد. آپوپتوز در ترمیم و نوسازی بافتی و نیز حذف سلول های T نقش دارد. هرگونه اختلال در روند آپوپتوز، می تواند منجر به ایجاد و رشد سلولهای سرطانی و یا بیماریهای خود ایمنی گردد. بالعکس افزایش غیر طبیعی مرگ سلولی در بیماریهایی نظیر اختلالات دژنراتیو عصبی و ایدز دیده می شود. داروهای شیمی درمانی سبب القاء آپوپتوز در سلول های سرطانی می شوند (۹۵).

آپوپتوز و نکروز دو مکانیسم اصلی مرگ سلولی می باشند و با هم تفاوت هایی دارند که می توان به شرح زیر خلاصه نمود:

۱- آپوپتوز مرگ فیزیولوژیک سلولی است و در طی تحریکات خاصی اتفاق می افتد. درحالی که نکروز مرگ پاتولوژیک سلول بوده و در طی آسیب های شدید به سلول از قبیل هیپوکسی، هیپرترمی و سموم خارجی، اتفاق می افتد.

۲- نکروز فرایند غیر فعال است و درغیاب ATP نیز اتفاق می افتد، در حالی که فرایند آپوپتوز فعال بوده و به انرژی وابسته می باشد.

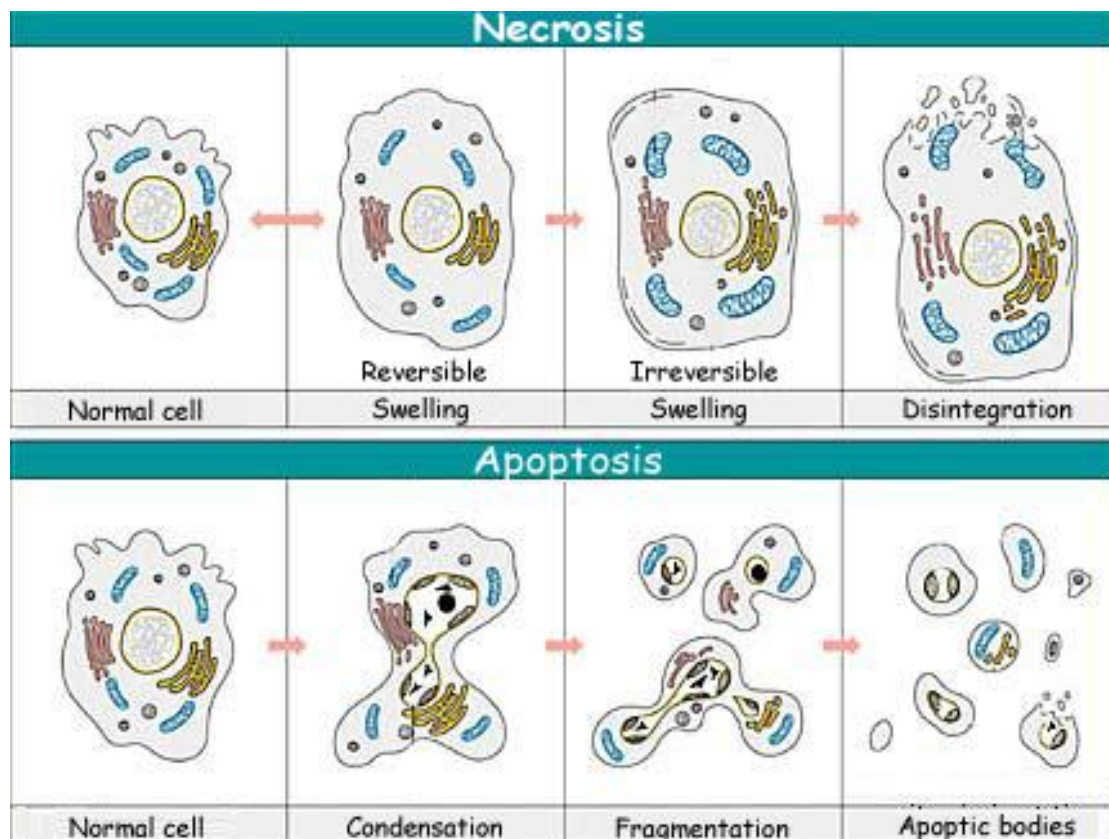
۳- در فرایند آپوپتوز، سلول چروکیده و کوچک می شود، در حالی که در نکروز، سلول متورم و بزرگ می شود.

۴- در آپوپتوز غشا سیتوپلاسمی به صورت اجسام آپوپتوتیک در می آیند، درحالی که در نکروز، غشا تخریب شده و سبب آزاد شدن محتویات داخل سلولی می شود.

۵- ارگانهای سیتوپلاسمی در فرایند آپوپتوز دست نخورده باقی می مانند، در حالی که در نکروز ارگانهای مذکور تخریب می شوند.

۶- بر عکس نکروز، در روند آپوپتوزیس، تراکم کروماتین و قطعه قطعه شدن مشاهده می گردد.

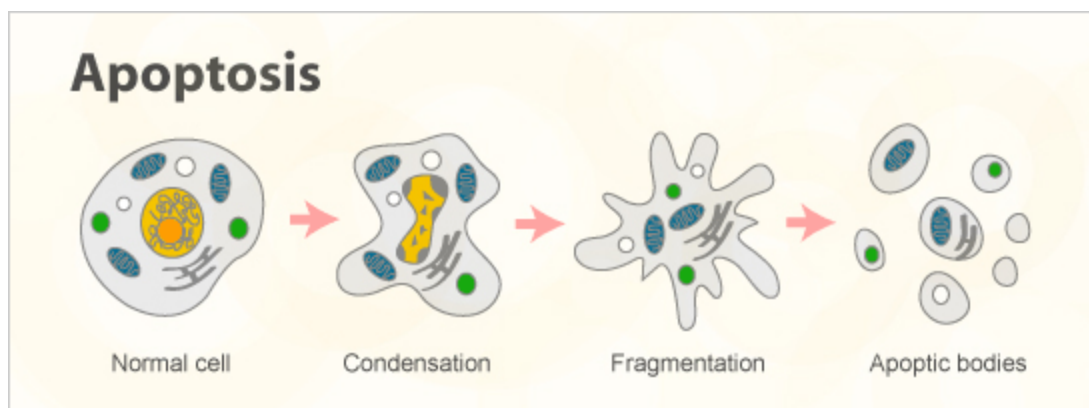
۷- وقوع نکروز در بافت، همراه با واکنش های التهابی است، در حالی که آپوپتوزیس بدون التهاب رخ می دهد (۹۶) (تصویر ۶).



تصویر ۶: تفاوت نکروز و آپتوز

مسیر های آپتوزیس:

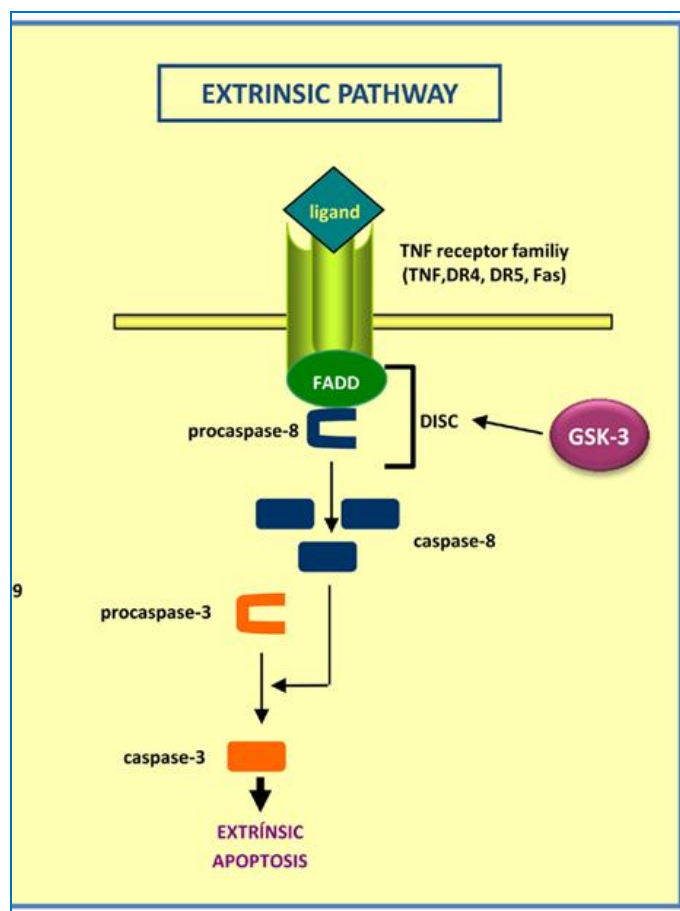
اولین علامت قابل مشاهده آپتوزیس، متراکم شدن کروماتین و چروک شدن سلول می باشد. غشای سلول چروک شده و سلول شروع به جدا شدن می کند (هسته قطعه قطعه می شود و DNA تکه تکه می شود) و بقایای سلول آپتوز شده، طی فرایندی از بین می رود (۹۷) (تصویر ۷). آپتوزیس در دو مسیر خارجی و داخلی صورت می گیرد.



تصویر ۷: فرایند آپوپتوزیس

مسیر خارجی یا آپوپتوزیس القاء شده توسط گیرنده های مرگ:

غشاء پلاسمایی اغلب سلول ها، گیرنده های مرگ وجود دارد. گیرنده های مرگ، اعضا ابر خانواده گیرنده فاکتور نکروز دهنده تومور (TNF) می باشند. زمانی که این گیرنده ها توسط لیگاندهای مربوطه تحریک شوند، سبب فعال شدن کاسپازها و القاء آپوپتوز می گردند. ویژگی این ابر خانواده وجود توالی غنی از سیستئین در بخش خارج سلولی است. این گیرنده در غشاء ها در بخش سیتوپلاسمی خود دارای توالی به نام ناحیه مرگ بوده و از این رو در انتقال پیام آپوپتوزی به درون سلول شرکت می نمایند. تحریک گیرنده های مرگ توسط لیگاندهای مربوطه، منجر به تریمریزاسیون گیرنده و به کارگیری پروتئین های آداپتور از قبیل FADD (Fas-associated death domain) می گردد. این عمل باعث تشکیل خوشه مرگ در ناحیه سیتوزولی گیرنده گردیده و باعث می شود که پروتئین آداپتور FADD به آن متصل شود. FADD نیز از ناحیه N ترمینال خود به پرودمین کاسپاز ۸ متصل شده و ایجاد کمپلکس DISC (death-inducing signaling complex) داده در نتیجه پروکاسپاز ۸ به کاسپاز ۸ فعال تبدیل می شود. کاسپاز ۸ فعال سبب فعال شدن کاسپاز های اجرایی شده و در نتیجه فرایند آپوپتوز صورت می گیرد (۹۸، ۹۹) (تصویر ۸).

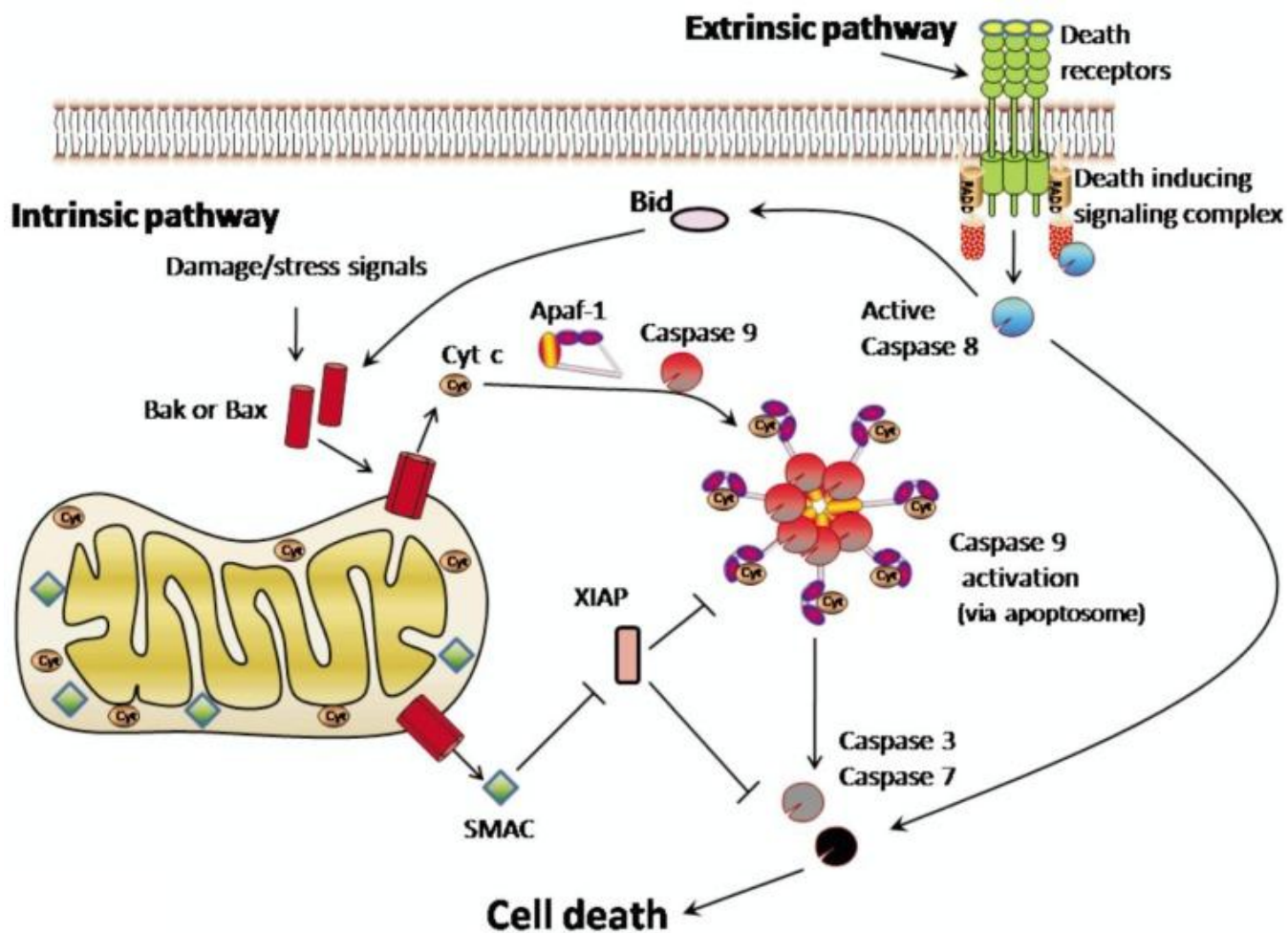


تصویر ۸: واکنش‌های آبخاری فعال شدن کاسپازها توسط گیرنده‌های مرگ در مسیر خارجی

مسیر داخلی یا مسیر میتوکندریایی آپوپتوزیس:

میتوکندری، هم در حیات و هم در مرگ سلولی دخالت دارد. این ارگانل، انرژی رایج سلول را به فرم ATP فراهم ساخته و هموستاز داخل سلولی را حفظ می‌نماید. در پاسخ به سیگنال‌های مرگ سلولی، نفوذ پذیری غشا خارجی میتوکندری، سبب آزاد شدن مولکول‌های پروآپوپتوتیک از قبیل فاکتور القاء کننده آپوپتوز AIF (Apoptosis inducing factor)، سیتوکروم C، smac/DIABLO (second mitochondria-derived activator of caspases) و اندونوکلئاز G از فضای بین دو غشا میتوکندری به داخل سیتوپلاسم می‌شوند. Smac/DIABLO اثر آنتاگونیستی روی مهار کنندگان کاسپاز دارد. و فاکتور القاء کننده آپوپتوز

(AIF) در حالت طبیعی نقش آنتی اکسیدانی در میتوکندری را به عهده دارد. مشخص شده که AIF آزاد شده از میتوکندری در طی روند آپوپتوز، سبب آسیب به DNA هسته ای در مسیر مستقل از کاسپاز ها می شود. سیتوکروم C هم بعد از خارج شدن از میتوکندری، به یک مولکول پروتئینی به نام Apaf-1 (Apoptotic protease activating factor 1) متصل شده و باعث الیگومر شدن آن و در نتیجه فعال شدن کاسپاز ۹ و کاسپاز ۹ فعال ، سبب فعال شدن کاسپاز های اجرایی از قبیل کاسپاز ۳ و ۷ می شود (۱۰۰، ۱۰۱). کاسپاز ها جزو خانواده سیستئین پروتئاز ها هستند که نقش محوری در شروع و فاز اجرایی آپوپتوز ایفا می نمایند. به دنبال فعال شدن کاسپازها، این آنزیم ها روی سوبستراهای خاصی عمل کرده، تغییرات بیوشیمیایی و مرفولوژیک مختلفی (از جمله چروک شدن سلول، متراکم شدن کروماتین و قطعه قطعه شدن DNA) در سلول ایجاد می نمایند و در نتیجه فرایند آپوپتوز صورت می گیرد (۱۰۲) (تصویر ۹).



تصویر ۹: واکنش های آبشاری فعال شدن کاسپازها در مسیر میتوکندریایی (مسیر داخلی)

بیان مسئله:

هیداتیدوز یا اکینوкокوزیس یک بیماری مشترک بین انسان و دام بوده و توسط فرم لاروی اکینوкокوس گرانولوزوس ایجاد می شود. این بیماری از نظر بهداشتی و اقتصادی حائز اهمیت بوده و می تواند به عنوان یک تهدید برای سلامتی باشد (۱، ۲). اکینوкокوزیس در بسیاری از نقاط دنیا پراکندگی داشته و در کشورمان ایران بومی است. میزبان های اصلی این انگل سگ سانان و میزبان های واسط آن علفخواران می باشند. این بیماری در انسان، توسط جایگزینی فرم لاروی انگل در اندامهای مختلف از جمله کبد، ریه، مغز ایجاد می شود (۴-۱). با توجه به اینکه عمل جراحی موثرترین روش درمانی هیداتیدوز می باشد، لذا انتخاب مواد پروتواسکولیسیدال موثر و کم ضرر قبل از عمل جراحی و تزریق آنها به داخل کیست ها خطر نشت پروتواسکولکس های زنده را کاهش داده و برای بسیاری از جراحان از اهمیت فراوانی برخوردار است (۵، ۶، ۷). در حال حاضر استفاده از مواد پروتواسکولیسیدال شیمیایی به جهت عوارض جانبی آنها محدود شده (۳، ۶، ۸) و استفاده از گیاهان دارویی به عنوان جایگزین مواد شیمیایی مورد توجه قرار گرفته است (۹)، چنانکه بعضی از آنها به عنوان مواد پروتواسکولیسیدال گزارش شده اند ولی جهت اطمینان از بی ضرر بودن آنها، تحقیقات بیشتر توسط محققین توصیه شده است (۸، ۱۰۳، ۱۰۴، ۱۰۵، ۱۰۶). ایمنی ذاتی انسان بر علیه کیست هیداتیک و لایه های آن بالاخص لایه ژرمینال، به عنوان یکی از مکانیسم های احتمالی در سرکوب کیست هیداتیک محسوب می شود (۱۰). اجزای مهم سلولی ایمنی ذاتی، نوتروفیل ها، ماکروفاژها، ائوزینوفیل ها، فیبروبلاستها و جزء پنجم مسیر آلترناتیو کمپلمان می باشند (۱۰۷). از مسیرهای جدید ایمنی ذاتی و ناشناخته میزبان علیه کیست هیداتیک، اینفلامزوم، تول لایک رسپتورها و آپوپتوزیس می باشد (۱۰۸، ۱۰۹)، که اخیرا آپوپتوزیس به عنوان بخش مهمی از ایمنی ذاتی میزبان در سرکوب انگل به اثبات رسیده است (۱۱) و این روش یکی از بهترین روشها در از بین بردن انگلهای اکینوкокوس گرانولوزوس می تواند باشد (۱۲). آپوپتوزیس مرگ سلولی برنامه ریزی شده است که توسط یکسری مکانیسم های بیوشیمیایی، مرفولوژیکی از قبیل فشردن کروماتین، قطعه قطعه شدن DNA، تولید اجسام آپوپتوتیکی و بیان مولکولهای آپوپتوتیک داخل سلولی و خارج سلولی انجام می

پذیرد (۱۱۰، ۱۱۱، ۱۱۲). آپوتوزیس عمدتاً از دو مسیر خارج سلولی متعلق به رسپتور مرگ و مسیر داخل سلولی میتوکندریایی انجام می گیرد (۱۱۳). گیرنده های مرگ، اعضای خانواده گیرنده فاکتور TNF می باشند و وقتی این گیرنده ها توسط لیگاندهای مربوطه تحریک شوند، سبب فعال شدن کاسپازها و القای آپوتوزیس می گردد (۱۱۴). مرگ سلولی برنامه ریزی شده، در طول تکامل نرمال موجودات در بسیاری از پستانداران اتفاق می افتد. مرگ سلولی در دوران رشد و نمو جنینی و تشکیل موفقیت آمیز ارگانها، یک امر اساسی است (۱۱۵). همچنین مسیر آپوتوزیس در موجودات، یک ابزار مفید برای از بین بردن سلولهای آسیب دیده و عفونی می باشد (۱۱۶، ۱۱۷). آپوتوزیس در بسیاری از بی مهرگان از جمله نماتودها، ترماتودها، بندپایان و سستودها از جمله کیست هیداتیک گزارش شده است (۱۰، ۱۲، ۱۱۸، ۱۱۹، ۱۲۰). با توجه به اینکه اثرات اسکولیسیدال عصاره گیاه دارویی مورد (*Myrtus communis*) در مطالعات قبلی شناسایی شده است ولی مکانیسم اثر داروی مذکور که می تواند در سرنوشت بیمار موثر باشد هنوز مشخص نشده، لذا در تحقیق حاضر احتمال مرگ سلولی برنامه ریزی شده و افزایش فعالیت کاسپازهای ۳، ۸ و ۹ توسط عصاره گیاه دارویی مورد بر روی پروتواسکولکس های کیست هیداتیک، مورد بررسی قرار گرفت.

فصل دوم

مروری بر متون

گیاه مورد با نام علمی *Myrtus Communis* از خانواده *Myrtaceae*، درختچه کوچکی است که ارتفاع ساقه آن در شرایط عادی بین ۱ تا ۳ متر می باشد. از مشخصات آن داشتن برگهایی همیشه سبز، پایا، متقابل، نوک تیز، بدون دندانه، چرمی، به رنگ سبز تیره و معطر می باشد. طول برگهای آن ۱ تا ۴ سانتی متر و عرض آن، ۰/۵-۱ سانتی متر بوده. درضمن اگر دقت شود نقاط کوچک و شفافی در سطح برگ آن مشاهده می شود. گل‌های نسبتاً درشت و زیبای گیاه مورد به رنگ سفید بوده و بوی مخصوصی دارند. پیدایش گل‌ها به صورتی است که مانند برگ‌ها، وضع متقابل داشته و در کنار آنها به ساقه می پیوندند. هر گل دارای ۵ گلبرگ مساوی و به صورت گسترده بوده و دارای پرچم‌های متعدد می باشد. میوه آن بیضوی یا مدور و به بزرگی یک نخود بوده و به رنگ سیاه مایل به آبی و به ندرت سفید و دارای طعمی گس و رزینی است. پوست ساقه مورد به صورت قطعاتی از آن جدا شده و مانند تمام قسمت‌های گیاه، بوی معطر از آن استشمام می شود. بر روی ساقه، برجستگی‌هایی به نام Galle وجود دارد که از آن در مصارف درمانی استفاده می شود. گیاه مورد در جنگل‌ها و زمین‌های بایر و همچنین در بین درختان زیتون و دامنه های کم درخت کوهستانی و اماکنی نظیر آنها می روید. مناطق پراکندگی گیاه مذکور در حوضه مدیترانه ای، آسیا، اروپای جنوبی و ایران (در نواحی شمالی از جمله گیلان، منجیل و در ارتفاعات ۲۵۰ تا ۳۰۰ متری لرستان، کرمان، فارس، بندر عباس، بلوچستان، خراسان و یزد) می باشد. به طور کلی این گیاه اغلب در زمین‌های مشرف به رودخانه ها و مناطق غیرزراعی دیده می شود و همیشه سبز بوده و خزان ندارد. برگ های گیاه حاوی ۱/۵-۲ درصد حجمی اسانس بوده و این اسانس ها شامل: ترپینولن (Terpinolen)، سینئول (Cineol)، لینالول (Linalol)، ترپینئول (Terpineol)، لینالیل استات (Linalyl acetate)، ترپینیل استات (Terpinenyl acetate)، ژرانیل والرات (Granyl valerate)، هگزیل بوتیرات (Hexyl butyrate) و سابینن (Sabinene) می باشد (۱۲۱). همچنین در

برگ گیاه مورد علاوه بر اسانس، تانن، فلاوونوئید و ویتامین C وجود داشته و فاقد آلکالوئید و گلیکوزیدهای قلبی می باشد (تصویر ۱۰) (۱۲۲).



تصویر ۱۰: گیاه مورد

عصاره گیاه مورد به علت داشتن ترکیبات فلاونوئیدی، تانن و فنولیک اسید، بعنوان ضد باکتری، ضد ویروس، ضد تومور، ضد عفونی کننده و ضد التهاب، مصرف دارویی دارد. در طب سنتی از قسمت‌های مختلف گیاه مورد از جمله برگ، ساقه، گل، شاخه و دانه آن استفاده می شود. چنانکه از شاخه گیاه در بیماری‌های اسهال، اگزما، پسوریازیس، آسم و اختلالات گوارشی استفاده می شود. دانه گیاه مذکور به صورت خوراکی برای درمان اسهال، اسهال خونی و بهبود زخم‌ها مناسب می باشد. گل‌های گیاه مورد برای بهبود رگ‌های واریسی مصرف موضعی دارد و برگ آن به عنوان ضد عفونی کننده، ملین، تسکین دهنده درد، ضدالتهاب و عامل ضد انعقاد استفاده می شود. گیاه مذکور در کاهش قند خون، درمان یبوست و التیام زخم‌های خارجی مورد استفاده قرار می گیرد

(۱۲۳). همچنین اثرات ضد قارچی (۱۲۴، ۱۲۵)، ضد باکتریایی (۱۲۸-۱۲۶) و ضد انگلی از جمله اسکولیسیدالی عصاره گیاه مورد، توسط محققین مختلف گزارش شده است (۱۳۲-۱۲۹).

بررسی های مختلفی در مورد مرگ سلولی برنامه ریزی شده توسط مواد مختلف همچنین گیاهان دارویی از جمله گیاه مورد، گیاهان هم خانواده آن و ترکیبات مختلف آنها بر روی سلول ها و میکروارگانیسم های مختلف از جمله پروتواسکولکس ها انجام شده است، چنانکه *Tretiakova* و همکاران در سال ۲۰۰۸ به بررسی القاء آپوپتوزیس ماده *Myrtucommulone* (مشتق از برگ گیاه مورد)، بر روی انواع رده های سلولهای سرطانی پرداختند. نتایج تحقیقات نشان داد که ماده مذکور می تواند باعث از دست رفتن پتانسیل غشاء میتوکندری در سلولهای سرطانی مذکور و آزاد سازی سیتوکروم C از میتوکندری شده و باعث افزایش فعالیت کاسپازهای ۳ و ۹ و مرگ سلولی رده های مختلف سلولهای سرطانی از مسیر میتوکندریایی گردد. در حالیکه بر روی کاسپاز ۸ هیچ اثری را نشان نداد (۱۳۳).

Izgi و همکاران در سال ۲۰۱۵ به مطالعه اثر سایتوتوکسیک و آپوپتوتیک *Myrtucommulone-A* (یک ترکیب فعال از مشتقات گیاه مورد) در مسیرهای داخلی و خارجی ، بر روی سلولهای سرطانی پرداختند و به این نتیجه رسیدند که ترکیب مذکور می تواند باعث افزایش بیان ژنهای آپوپتوز از جمله Fas، FasL، TNF و افزایش فعالیت کاسپاز ۴ گردد و این واکنش ها را وابسته به دوز گزارش کردند. همچنین نشان دادند که ماده فوق می تواند به عنوان یک ترکیب درمانی بالقوه در مسیرهای آپوپتوز، ایفای نقش کند (۱۳۴).

در سال ۲۰۱۷ محققین به بررسی اثرات مواد شیمیایی *Epirubicin* و *Cisplatin* به همراه *Myrtucommulone-A* (ترکیب فعال از گیاه مورد) بر روی سلولهای سرطانی سینه موش پرداختند و به این نتیجه رسیدند که اثرات آپوپتوتیک ترکیبات مذکور به همراه ترکیب گرفته شده از گیاه مورد بیشتر از ترکیبات فوق (به تنهایی) بر روی سلولهای سرطانی موثر می باشد (۱۳۵).

در سال ۲۰۱۴ محققین به مطالعه مهار رشد و آپوپتوزیس سلول های سرطانی موش توسط عصاره متانولی اکالیپتوس (*Eucalyptus Camaldulensis*) از خانواده موردیان (*Myrtaceae*)، پرداختند. آنها از مهار کننده های کاسپازهای ۳ و ۸ برای پی بردن به مسیر آپوپتوتیک در سلولهای سرطانی استفاده کردند. اطلاعات بدست آمده از آزمایش، نشان داد که القاء آپوپتوزیس از طریق مسیر وابسته به کاسپاز ۳ صورت گرفته است و کاسپاز ۸ نقشی در مرگ سلولی سلولهای سرطانی نداشت (۱۳۶).

برخی از محققین در سال ۲۰۱۲ به بررسی فعالیت ضد تکثیری و آپوپتوتیک عصاره اتیل استاتی یک نوع اکالیپتوس به نام *Eucalyptus Citridora resin* از خانواده موردیان (*Myrtaceae*) و یک ترکیب مهم بیواکتیو آن (ترکیب فلاوانولی)، بر روی سلولهای ملانوما پرداختند. محققین فوق اثرات ضد تکثیری عصاره اتیل استاتی گیاه فوق و ترکیب فلاوانولی آن را نشان دادند و گزارش کردند که عصاره و ترکیب بیواکتیو گیاه مذکور می تواند باعث کاهش پتانسیل غشاء میتوکندری سلولهای مورد مطالعه و افزایش بیان نسبت BAX/Bcl-2 و همچنین افزایش فعالیت کاسپاز ۳ شوند و متعاقب آن باعث مرگ سلولی و القاء آپوپتوزیس بر روی سلولهای ملانوما شوند (۱۳۷).

برخی از پژوهشگران با مطالعه و جداسازی یک فلاونوئید بنام کامفرول (*Kaempferol*)، یکی از مشتقات گونه های اکالیپتوس (*Eucalyptos occidentalis*) و تاثیر آن بر روی سلول های سرطانی میلوئیدی، به این نتیجه رسیدند که ماده مذکور می تواند باعث تغییرات مورفولوژیک، قطعه قطعه شدن DNA و مرگ سلولی برنامه ریزی شده توسط افزایش فعالیت کاسپازهای ۳ و ۸ و آزاد سازی سیتوکروم C از میتوکندری گردد (۱۳۸).

Islam و همکاران در سال ۲۰۱۵ به بررسی اثرات آپوپتوتیک ماده *p-menth-1-ene-4,7-diol(EC-1)* که مشتق از یکی از گونه های اکالیپتوس به نام *Eucalyptus camaldulensis Dhnh* از خانواده موردیان (*Myrtaceae*) می باشد، بر روی سلولهای سرطانی Ehrlich پرداختند. آنها برای بررسی آپوپتوزیس، از

میکروسکوپ ایمونوفلوروسنت، آزمون قطعه قطعه شدن DNA، فلوسایتومتری و همچنین PCR (polymerase chain reaction) برای بررسی بیان ژن های آپوپتوتیک استفاده کردند. نتایج حاصل نشان داد که ماده مذکور (EC-1) می تواند باعث بیان ژن های مرتبط با آپوپتوزیس در سلول سرطانی تحت مطالعه باشد. بعلاوه گزارش کردند که ماده مذکور دارای فعالیت ضد توموری وابسته به دوز بوده و می تواند به عنوان یک ترکیب ضد سرطانی و ضد تکثیری در بررسی آپوپتوزیس در مدل های سلولی و موشی کاربرد داشته باشد (۱۳۹).

در سال ۲۰۱۷ Jian و همکاران به بررسی اثر آپوپتوتیک ماده *Eucalrobosone C*، که یک ترکیب جدا شده از برگ یک گونه اکالیپتوس به نام *Eucalyptus robusta* (هم خانواده با گیاه مورد) می باشد را بر روی سلولهای سرطانی کبد، با استفاده از روش فلوسایتومتری پرداختند. نتایج نشان داد که ماده مذکور (*Eucalrobosone C*) فعالیت ضد تکثیری قوی وابسته به غلظت و زمان بر روی سلولهای سرطانی کبد داشته و باعث القاء آپوپتوزیس از طریق مسیر میتوکندری وابسته به کاسپاز، بر روی سلولهای سرطانی کبد می شود (۱۴۰).

در سال ۲۰۰۸ برخی از محققین به مطالعه اثرات آپوپتوتیک عصاره گیاه *Syzgium cumini* از خانواده موردیان (*Myrtaceae*) بر روی سلولهای سرطانی دهانه رحم پرداختند. در این مطالعه از غلظت های مختلف از عصاره گیاه و مدت زمانهای متفاوت مواجهه استفاده گردید. نتایج آنها نشان داد که عصاره گیاه فوق می تواند باعث مرگ سلولی شود که این امر وابسته به غلظت و زمان، بود (۱۴۱).

برخی از پژوهشگران چینی در سال ۲۰۱۴ به بررسی اثرات آپوپتوتیک و مهار رشد در رده های سلولی سرطان کولون انسان، توسط عصاره اتیل استاتی گیاه (*Syzygium aromaticum*) *Clove* از خانواده موردیان (*Myrtacea*) و یک ترکیب بیواکتیو استخراج شده از آن بنام اولئانولیک اسید، (*Oleanolic acid*) به صورت برون تنی و درون تنی پرداختند. با توجه به نتایج حاصله گزارش کردند که عصاره گیاه مذکور و ماده استخراج شده از آن، هر دو خاصیت سائتوتوکسیک بر روی سلولهای سرطانی داشتند. همچنین متخصصین فوق

با استفاد از فلوسایتومتری نشان دادند که عصاره گیاه فوق می تواند باعث توقف چرخه سلولی در فاز G0/G1 و القاء آپوپتوزیس در سلولهای مورد آزمایش شود که این اثر وابسته به غلظت بود (۱۴۲).

در سال ۲۰۱۴ برخی از پژوهشگران به بررسی القاء آپوپتوزیس توسط اسانس گرفته شده از گل‌های گیاه *Syzygium aromaticum* (از خانواده موردیان) بر روی پروماستیگوت های لیشمانیا دونووانی پرداختند و توسط gas chromatography وجود مواد *Eugenol* و استات *Eugenol* در اسانس مذکور را تایید کردند. نتایج آنها نشان داد که اسانس فوق می تواند باعث خارج کردن فسفاتیدیل سرین و توقف چرخه سلولی در فاز G0/G1، کاهش پتانسیل غشاء میتوکندری و همچنین مرگ سلولی برنامه ریزی شده بر روی پروماستیگوت ها و آماستیگوت های لیشمانیا دونووانی گردد (۱۴۳). همچنین در تحقیق دیگر در سال ۲۰۱۱ برخی از محققین هندی به بررسی القاء آپوپتوزیس توسط ماده *Eugenol* بر روی سلولهای سرطانی کولون پرداختند. نتایج آنها نشان داد که این ماده باعث افزایش تجمع سلولها در فاز sub-G1، قطعه قطعه شدن DNA، افزایش القاء آپوپتوزیس و افزایش فعالیت کاسپاز ۳ بر روی سلولهای کولون می گردد. در تحقیق ما نیز همسو با تحقیقات فوق عصاره گیاه مورد توانست باعث افزایش فعالیت کاسپاز ۳ و مرگ پروتواسکولکس های کیست هیداتید گردد (۱۴۴).

در سال ۲۰۱۲ *Bontempo* و همکاران به بررسی اثرات ضد سرطانی و آپوپتوتیک عصاره *Psidium guajava L.* (از خانواده موردیان) بر روی سلولهای سرطانی پرومیلوسیت پرداختند. نتایج آنها نشان داد که عصاره گیاه مذکور فعالیت ضد تکثیری داشته و همچنین باعث القاء آپوپتوزیس، افزایش فعالیت کاسپاز های ۸ و ۹، افزایش بیان *FasL*، *TNF* و پروتئین پروآپوپتوتیک (*BAD*) بر روی سلولهای سرطانی شده (۱۴۵).

Pascoal و همکاران در سال ۲۰۱۴ به بررسی فعالیت ضد تکثیری و القاء آپوپتوزیس عصاره اتانولی استخراج شده از گیاه *Campomanesia adamantium* (از خانواده موردیان) بر روی سلولهای سرطانی پروستات پرداختند. آنها نشان دادند که عصاره مذکور می تواند از طریق قطعه قطعه شدن DNA باعث القاء آپوپتوزیس

برروی سلولهای سرطانی پروستات داشته باشد که این امر وابسته به دوز بود. محققین فوق اثر آپوپتوتیک گیاه مذکور را به وجود ترکیب *Chalcone Cardamonin* آنالیز شده از گیاه فوق نسبت دادند (۱۴۶). در تحقیقی مشابه محققین چینی در سال ۲۰۱۴ به بررسی القاء آپوپتوزیس توسط ماده *Chalcone* استخراج شده از گیاه *Cleistocalyx operculatus* (از خانواده موردیان) بر روی سلولهای کبدی پرداختند. نتایج مطالعات آنها نشان داد که ماده مذکور می تواند باعث قطعه قطعه شدن *DNA*، کاهش فعالیت *mRNA* و القاء آپوپتوزیس در سلولهای سرطانی کبد شود و این اثر را وابسته به دوز گزارش کردند (۱۴۷).

برخی از محققین در سال ۲۰۱۵ به بررسی القاء آپوپتوزیس عصاره گیاه *Leptospermum flavescens* معروف به سنای مکی (از خانواده موردیان)، بر روی سلولهای سرطانی ریه انسان پرداختند. نتایج آنها نشان داد که این گیاه اثرات سایتوتوکسیک موثری بر روی سلولهای سرطانی ریه داشته و باعث توقف چرخه سلولی در فاز *G0/G1* می شود و همچنین نشان دادند که گیاه مذکور می تواند باعث القاء آپوپتوزیس و افزایش فعالیت کاسپاز ۳ گردد که این امر وابسته به دوز بود (۱۴۸).

Hsieh و همکاران در سال ۲۰۰۷ به مطالعه آپوپتوتیک عصاره آبی گیاه *Psidium guajava* از خانواده موردیان (*Myrtaceae*) بر روی سلولهای اندوتلیال بند ناف انسان پرداختند. نتایج بدست آمده نشان داد که عصاره گیاه مذکور می تواند با فعال سازی فاکتورهای هسته ای باعث آپوپتوزیس سلولهای اندوتلیال شود و این اثرات را به مواد پلی فنلی جدا شده از آن نسبت دادند (۱۴۹).

برخی محققان چینی در سال ۲۰۱۶ به بررسی القاء آپوپتوزیس ترکیبات گیاه *Zanthoxylum bungeanum* بر روی سلولهای سرطانی پوست پرداختند. مطالعات آنها نشان داد که ترکیبات گیاه مذکور می تواند بصورت وابسته به دوز باعث مهار تکثیر سلولهای سرطانی شود. همچنین گزارش کردند که عصاره گیاه مذکور می تواند باعث توقف چرخه سلولی در فاز *S*، افزایش فعالیت کاسپازهای ۳، ۸ و ۹، افزایش بیان *Bax* و کاهش سطح *Bcl-2* در سلولهای سرطانی گردند و در نتیجه باعث القاء آپوپتوزیس از هر دو مسیر داخلی و خارجی شوند. محققین

فوق اثرات مذکور را به ترکیبات آنالیز شده گیاه مذکور از جمله *Terpinen* و *Limonene* نسبت دادند (۱۵۰).

محققین چینی در سال ۲۰۱۴ به بررسی اثر مهار رشد سلولی و القاء آپوپتوزیس توسط ماده ای بنام 4-*Terpineol* بر روی سلولهای سرطانی کبد پرداختند. در این مطالعه ماده مذکور را با غلظت های مختلف (۰، ۴۰، ۸۰، ۱۶۰، ۲۳۰ و ۴۴۰ میکروگرم در میلی لیتر) به مدت ۴۸ ساعت با سلولهای سرطانی فوق مواجه کردند و با استفاده از آزمون قطعه قطعه شدن *DNA* و روش فلوسایتومتری به بررسی آپوپتوزیس پرداختند. نتایج آنها نشان داد که ماده مذکور می تواند باعث القاء آپوپتوز بر روی سلولهای سرطانی شود که این امر را وابسته به دوز و زمان گزارش کردند (۱۵۱).

برخی محققین به بررسی القاء آپوپتوزیس توسط کریسین (*Chrysin*) (یک نوع فلاونوئید گیاهی موجود در عسل و برخی از گیاهان)، با غلظت های مختلف (۰، ۱۰، ۳۰ و ۱۰۰ میکرومول) بر روی سلولهای بدخیم ملانوما در چشم پرداختند. نتایج آنها نشان داد که ماده مذکور می تواند در غلظت های ۳۰ و ۱۰۰ میکرومول باعث کاهش ویابیلیتی سلولهای سرطانی ملانوما شده و باعث افزایش نفوذ پذیری میتوکندری و آزاد سازی سیتوکروم C و افزایش فعالیت کاسپاز های ۳ و ۹ شود که این امر با افزایش غلظت ارتباط مستقیم داشت. در بررسی فوق، هیچ افزایشی در فعالیت کاسپاز ۸ دیده نشد (۱۵۲).

علاوه بر تحقیقات فوق، بررسی های دیگری در مورد مکانیسم های مختلف آپوپتوزیس بر روی پروتواسکولکس ها صورت گرفته است، چنانکه اسپوتین و همکاران (۱۳۹۱)، طی تحقیقی بیان مولکول های القاء کننده آپوپتوزیس *Fas-L*، *TRAIL* در سطح لایه ژرمینال کیست هیداتیک نابارور و کیست بارور و بافت سالم اطراف آن را مورد بررسی قرار دادند و بیان مولکول های القاء کننده آپوپتوزیس در کیست های نابارور در مقایسه با کیست های بارور و بافت سالم را در سطح نسبتا بالایی یافتند و احتمال آپوپتوزیس بر علیه لایه ژرمینال کیست بارور را به عنوان یکی از مسیرهای مهم در نابارور شدن کیست ها گزارش کردند (۱۵۳).

تحقیقی دیگر *Parades* و همکاران نیز در سال ۲۰۰۷ احتمال آپوپتوزیس در باروری و غیر باروری کیست های هیداتیک را با استفاده از آنالیز قطعات *DNA* مورد بررسی قرار دادند و مشاهده کردند سطح آپوپتوزیس در کیست های غیربارور بیشتر است (۱۰). همچنین در تحقیقات دیگر نیز اثر مواد مختلف از جمله دگزامتازون، *H2O2* و پرازی کوانتل بعنوان عامل آپوپتوزیس در پروتواسکولکس ها گزارش شده (۱۵۴-۱۵۶).

فصل سوم

اهداف و فرضیات:

هدف اصلی

تعیین مرگ سلولی برنامه ریزی شده پروتواسکولکس های کیست هیداتیک پس از مواجهه با گیاه دارویی مورد

اهداف فرعی

- تعیین اثر رقت های مختلف گیاه دارویی مورد در مرگ سلولی برنامه ریزی شده پروتواسکولکس های کیست هیداتیک

- تعیین اثر رقت های مختلف گیاه دارویی مورد بر تولید کاسپاز ۳ در پروتواسکولکس های کیست هیداتیک.

- تعیین اثر رقت های مختلف گیاه دارویی مورد بر تولید کاسپاز ۸ در پروتواسکولکس های کیست هیداتیک.

- تعیین اثر رقت های مختلف گیاه دارویی مورد بر تولید کاسپاز ۹ در پروتواسکولکس های کیست هیداتیک.

اهداف کاربردی

شناسایی داروهای گیاهی با غلظت های مشخص که به روش مرگ برنامه ریزی شده سبب مرگ پروتواسکولکس ها شده و بتوانند در آینده بعنوان یک دارو با عوارض کمتر استفاده شوند.

فرضیه ها (Hypothesis) یا سؤال های پژوهش

- رقت های مختلف گیاه دارویی مورد در مرگ سلولی برنامه ریزی شده پروتواسکولکس های کیست هیداتیک موثر است.

- رقت های مختلف گیاه دارویی مورد بر تولید کاسپاز ۳ در پروتواسکولکس های کیست هیداتیک موثر است.

- رقت های مختلف گیاه دارویی مورد بر تولید کاسپاز ۸ در پروتواسکولکس های کیست هیداتیک موثر است.

- رقت های مختلف گیاه دارویی مورد بر تولید کاسپاز ۹ در پروتواسکولکس های کیست هیداتیک موثر است.

جدول ۱: جدول متغیرها

| مقیاس | تعریف علمی | کیفی | | کمی | | وابسته | مستقل | عنوان متغیر |
|--|--|---------|------|-------|--------|--------|-------|-------------------------------|
| | | رتبه ای | اسمی | گسسته | پیوسته | | | |
| رنگ پذیری یا عدم رنگ پذیری با اثوزین ۰/۱٪ | زنده ماندن پروتواسکولکس ها در لوله های حاوی نمونه های مورد آزمایش | | ✓ | | | ✓ | | ویابیلیتی کیست های هیداتیک |
| دارد / ندارد | اثر گذاری عصاره گیاهان دارویی روی پروتواسکولکس ها | | ✓ | | | | ✓ | اثر عصاره گیاه دارویی |
| میکرومول | مقدار ماده تولید شده در مایع رویی حاصل از کشت سلولی | | | | ✓ | ✓ | | کاسپاز |
| درصد | مقدار درصد مرگ پروتواسکولکس | | | | ✓ | ✓ | | مرگ برنامه ریزی شده |

نوع مطالعه:

Control trial (پایه - تجربی)

بررسی های آماری:

داده های جمع آوری شده توسط نرم افزار آماری SPSS آنالیز و با استفاده از جداول و نمودارهای مناسب نمایش داده شده و سپس با آزمون های آماری t-test، آنالیز واریانس یک طرفه ANOVA و آزمون تعقیبی Tukey مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. سطح معنی دار آزمون ها ۵٪ در نظر گرفته شد.

فصل چهارم

مواد و روش ها

تجهیزات مورد نیاز :

۱- سمپلر متغیر ۱۰-۱ لاندا

۲- سمپلر متغیر ۱۰۰-۱۰ لاندا

۳- سمپلر متغیر ۱۰۰۰-۱۰۰ لاندا

۴- پنس

۵- قیچی

۶- اسکالپل

۷- سانتریفیوژ

۸- میکروسانتریفیوژ

۹- ترازوی دیجیتال

۱۰- انکوباتور ۳۷ درجه حاوی ۵٪ CO_2

۱۱- اتوکلاو

۱۲- الایزا ریدر با طول موج ۴۰۰-۶۰۰ نانومتر

۱۳- PH متر

۱۴- تایمر

۱۵- هود

وسایل مصرفی :

۱- پلیت کشت سلولی ۹۶ خانه ته صاف

۲- پلیت الایزا

۳- سرنگ ۵ و ۱۰ سی سی

۴- لام

۵- لامل

۶- لوله فالكون ۱۵ و ۵۰ سی سی

۷- پیپت پاستور

۸- میکروتیوب در سایزهای مختلف

۹- سر سمپلر زرد

۱۰- سر سمپلر آبی

۱۱- سر سمپلر کریستالی

۱۲- بر چسب

۱۳- دستکش لاتکس

۱۴- دستکش یکبار مصرف

محلول ها و مواد مصرفی :

۱- جنتا مایسین

۲- بافر PBS با PH ۷/۴- ۷/۲ (NaCl 8gr, KCL 0.2 gr , Na_2HPO_4 1.150 gr, KH_2PO_4 0.2 gr)

مواد فوق در مقداری آب مقطر حل شده و در نهایت به حجم ۱ لیتر رسانده شد. سپس PH آن با PH متر تنظیم شده و اتوکلاو گردید. پس از خارج کردن از اتوکلاو و خنک نمودن آن، مقدار ۱ میلی لیتر جنتا مایسین به آن اضافه شد.

۳- الکل ۷۰ درجه

۴- عصاره گیاه دارویی مورد

۵- سرم فیزیولوژی

۶- بافر DMSO (Merk)

کیت های مورد نیاز :

۱- کیت مرگ سلولی Cell Death Detection ELISAPLUS (Roche)

۲- کیت کاسپاز ۳ Caspase 3 Assay Kit Colorimetric (Abcam)

۳- کیت کاسپاز ۸ Caspase 8 Assay Kit Colorimetric (Abcam)

۴- کیت کاسپاز ۹ Caspase 9 Assay Kit Colorimetric (Abcam)

۵- کیت اندازه گیری پروتئین به روش برادفورد (Biotek)

۶- محیط کشت سلولی RPMI 1640 (Gibco)

روش کار :

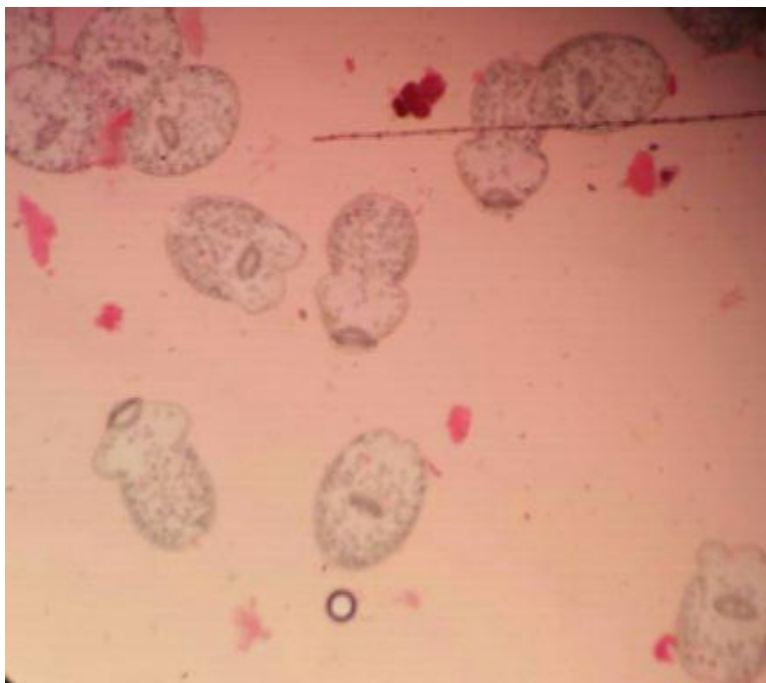
تهیه عصاره گیاهی:

عصاره گیاه مورد توسط متخصص گیاه شناسی از مزرعه پژوهشکده گیاهان دارویی کرج شناسایی و جمع آوری شد. یک نمونه از گیاه، در پژوهشکده ثبت و نگهداری و بقیه در سایه خشک شد. برای تهیه عصاره، پس از خشک کردن و آسیاب کردن گیاه (مقدار نیم کیلو گرم) ابتدا توسط اتانول و به وسیله دستگاه پرکولاتور عصاره

گیری انجام شد. این عمل سه بار تکرار و سپس عصاره حاصل بوسیله دستگاه تقطیر در خلاء تغلیظ گردید. میزان عصاره خشک شده محاسبه و در ظروف پلیت در دار، در داخل یخچال تا هنگام آزمایش نگهداری شد (۱۵۷).

تهیه کیست های هیداتید و جدا سازی پروتواسکولکس ها:

کبد و ریه های آلوده به کیست هیداتید، از کشتارگاه قزوین تهیه و به بخش انگل شناسی دانشگاه علوم پزشکی قزوین منتقل شدند. سطوح خارجی کیست ها با محلول بتادین و الکل ۷۰ درجه ضد عفونی شده و با رعایت شرایط استریل، محتویات کیست ها با سرنگ تخلیه و در زیر هود، در لوله های فالكون استریل ریخته شد. سپس با تیغ اسکالپل استریل، جدار کیست ها پاره شده و پروتواسکولکس ها کاملاً جمع آوری و به لوله ها اضافه شد. برای اطمینان از مناسب بودن نمونه های بدست آمده، پس از سانتریفیوژ آنها، از رسوب حاصله که حاوی پروتواسکولکس ها بود، مقداری برداشته و پس از رنگ آمیزی با ائوزین ۰/۱ درصد در زیر میکروسکوپ، درصد زنده بودن (*Viability*) آنها بررسی گردید. پروتواسکولکس هایی که *Viability* آنها بالای ۹۰٪ بود، جهت آزمایش انتخاب شدند (۱۵۸، ۱۵۹) (تصویر ۱۱). پروتواسکولکس های جمع آوری شده، با محلول PBS حاوی جنتامایسین، ۳ بار شستشو داده شده و رسوب حاصله وارد لوله های فالكون استریل حاوی ۵ میلی لیتر PBS گردیده و به یخچال منتقل شدند. جهت بررسی آپوپتوزیس و اندازه گیری کاسپاز ها در نمونه های جمع آوری شده، تعداد پروتواسکولکس ها در حجم معین PBS، مشخص گردید. جهت این کار پس از مخلوط کردن کامل پروتواسکولکس ها، مقدار ۲۰۰ لاندا از آن برداشته و در یک میکروتیوب ریخته شد و پس از Spin کردن کامل محتویات میکروتیوب مذکور، مقدار ۲۰ لاندا از آن روی لام گذاشته شده و پروتواسکولکس ها در زیر میکروسکوپ شمارش گردید. در نهایت تعداد کل پروتواسکولکس ها در حجم نهایی محاسبه و برای مراحل بعدی آزمایش، در یخچال قرارداداده شد.



تصویر ۱۱: پروتواسکولکس های زنده اکینوکوکوس گرانولوزوس قبل از مواجهه با عصاره گیاه مورد

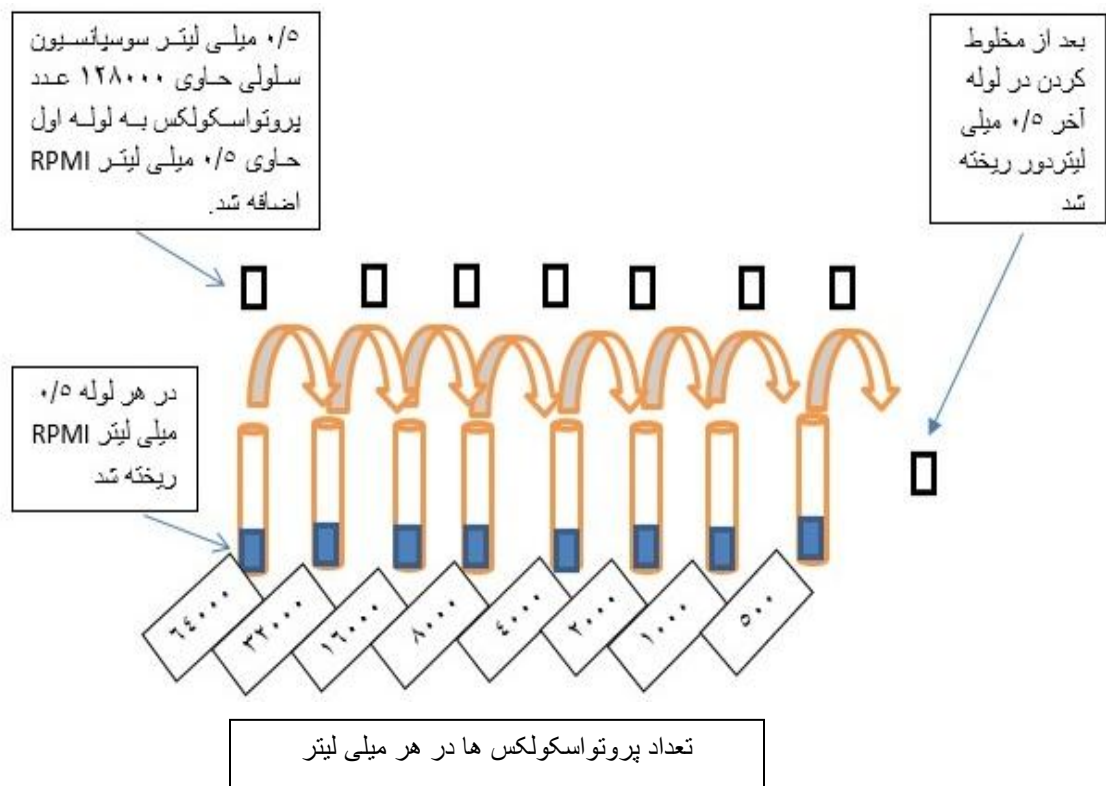
تعیین تعداد مناسب پروتواسکولکس ها جهت مواجهه با عصاره گیاه مورد:

بر اساس دستورالعمل کیت اندازه گیری کاسپاز های ۳، ۸ و ۹، لازم بود تعداد مناسب پروتواسکولکس ها، جهت مجاور کردن با عصاره گیاه مورد و همچنین مقدار پروتئین نمونه های نهایی مورد آزمایش، مشخص شود. طبق دستورالعمل مذکور، میزان پروتئین قابل اندازه گیری، بین $200 - 50 \mu\text{g}$ و تعداد مناسب سلول های مورد استفاده، $10^6 \times 5 - 1$ توصیه شده است. به علت بزرگ بودن پروتواسکولکس ها، باید تعداد آنها طوری در نظر گرفته می شد که در نهایت میزان پروتئین نمونه های بدست آمده از لیز آنها توسط بافر لیز کننده^۱، بین $200 - 50 \mu\text{g}$ باشد. لذا برای بدست آوردن این تعداد، رقت های سریالی از پروتواسکولکس ها به ترتیب به تعداد 64000 ، 32000 ، 16000 ، 8000 ، 4000 ، 2000 ، 1000 و 500 با RPMI تهیه شد. جهت این کار ۸ لوله انتخاب و در همه لوله ها مقدار 0.5 ml RPMI ریخته شد. سپس 0.5 ml از سوسپانسیون پروتواسکولکس ها که حاوی 128000 پروتواسکولکس در میلی لیتر بود به لوله اول اضافه گردید. بعد از مخلوط

1- Lysis buffer

کردن، ۰/۵ ml از آن به لوله بعدی منتقل شده و این کار تا لوله آخر ادامه یافت. در نهایت ۰/۵ ml از لوله آخر بیرون ریخته شد (تصویر ۱۲). در نهایت ۲۰۰ میکرولیتر از رقت های مذکور با ۲۰۰ میکرولیتر از عصاره گیاه مورد با موثرترین غلظت که در تحقیقات قبلی مشخص شده (۲۵mg/ml) (۱۳۲)، مجاور گردید و تحت شرایط مورد اشاره در کیت های فوق الذکر (دمای ۳۷ درجه، با حضور CO2 و به مدت ۴ ساعت) انکوبه شدند. بعد از انکوباسیون، محتویات میکروتیوب ها (سوسپانسیون پروتواسکولکس ها و عصاره گیاه) به مدت ۱۰ دقیقه با ۲۰۰ g RCF^۱ سانتریفیوژ شدند و در نهایت محلول رویی دور ریخته شد. پروتواسکولکس های رسوب کرده سه بار با محلول PBS شستشو داده شدند تا بقایای عصاره گیاهی کاملاً از محیط خارج شود. سپس به رسوب پروتواسکولکس ها بافر لیز کننده اضافه شد و به مدت ۳۰ دقیقه در یخ انکوبه گردید. در ادامه، مجدداً با شرایط فوق، سانتریفیوژ تکرار و محلول رویی جدا و لیل گذاری شد. جهت تعیین میزان پروتئین نمونه های مذکور از روش براد فورد استفاده شد.

¹ - Relative centrifugal force



تصویر ۱۲ : روش تهیه رقت های سریالی از پروتواسکولکس ها

تعیین میزان پروتئین مایع رویی حاصل از لیز پروتواسکولکس ها، با استفاده از روش براد فورد:

کیت اندازه گیری پروتئین، حاوی آلبومین سرم گاو^۱ با غلظت ۵ mg/ml به عنوان استاندارد ذخیره و محلول برادفورد بود. جهت رسم منحنی استاندارد، ابتدا استاندارد ذخیره (آلبومین) به نسبت ۱:۱۰ با PBS رقیق و غلظت ۵۰۰ µg/ml تهیه گردید. سپس ۸ لوله آزمایش انتخاب و به هریک مطابق جدول ۲، مقداری از محلول استاندارد رقیق شده، محلول رقیق کننده و معرف براد فورد اضافه گردید تا غلظت های ۵۰ ، ۲۵ ، ۰ µg/ml ، ۱۰۰ ، ۲۰۰ ، ۳۰۰ ، ۴۰۰ و ۵۰۰ از استاندارد تهیه شود. در نهایت ۸ لوله نیز جهت رقت های تهیه شده از محلول رویی حاصل از لیز پروتواسکولکس ها در نظر گرفته شد. به این لوله ها ۲۰ لانداسوسپانسیون حاصل از لیز پروتواسکولکس ها و ۲۰۰ لاند محلول براد فورد اضافه گردید (جدول ۳) و بعد از ۵ دقیقه انکوباسیون در دمای اتاق، جذب نوری لوله ها در طول موج ۵۹۵ نانومتر قرائت شد (جدول ۳).

جدول ۲: محلول های لازم و مقادیر آنها برای رسم منحنی استاندارد تست براد فورد

| Number of Tube solutions | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 |
|---------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| BSA ST ^۲ (µL) | 0 | 1 | 2 | 4 | 8 | 12 | 16 | 20 |
| Diluent ^۳ (µL) | 20 | 19 | 18 | 16 | 12 | 8 | 4 | 0 |
| Bradford solution (µL) | 200 | 200 | 200 | 200 | 200 | 200 | 200 | 200 |
| Concentration (µg/ml) | 0 | 25 | 50 | 100 | 200 | 300 | 400 | 500 |

-
- 1- Bovine serum albumin
 2- Bovine serum albumin standard
 3- PBS buffer or normal saline

جدول ۳: محلول های لازم و مقادیر آنها برای تعیین میزان پروتئین مایع رویی حاصل از پروتواسکولکس ها

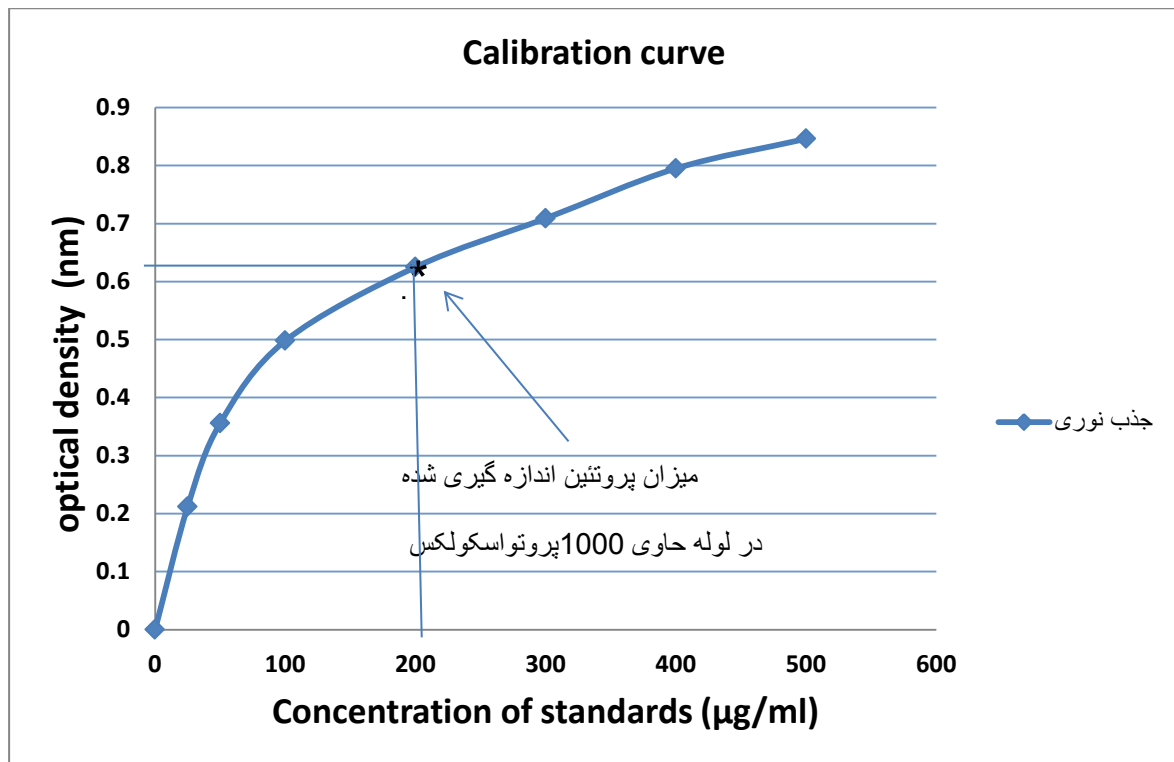
| Number of Tube solutions | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 |
|--------------------------|-------|-------|-------|------|------|-------|-------|-------|
| Sample (μL) | 20 | 20 | 20 | 20 | 20 | 20 | 20 | 20 |
| Bradford solution (μL) | 200 | 200 | 200 | 200 | 200 | 200 | 200 | 200 |
| Number of protoscolices | 500 | 1000 | 2000 | 4000 | 8000 | 16000 | 32000 | 64000 |
| Optical density (595 nm) | 0.324 | 0.619 | 0.859 | 1.04 | 1.95 | >2 | >2 | >2 |
| Concentration(μg/ml) | 42 | 200 | 495 | >500 | >500 | >500 | >500 | >500 |

بعد از خواندن جذب نوری استاندارد ها و نمونه ها، منحنی استاندارد با استفاده از نرم افزار اکسل ترسیم و جذب

نوری نمونه ها با منحنی استاندارد مقایسه گردید. تعداد مناسب پروتواسکولکس ها که بعد از انکوباسیون، باعث

آزاد شدن حدود ۲۰۰ میکروگرم پروتئین شده بود، ۱۰۰۰ عدد در میلی لیتر بدست آمد (منحنی ۱).

منحنی ۱: منحنی کالیبراسیون تست براد فورد و مقایسه جذب نوری *super nat ant* حاصل از پروتواسکولکس ها با جذب نوری استانداردها



تهیه رقت های ۵ mg/ml ، ۵۰ و ۱۰۰ از عصاره گیاه دارویی مورد:

ابتدا مقدار ۰/۸ گرم از عصاره گیاه دارویی مورد با ترازوی دیجیتال (با دقت ۴ رقم اعشار) وزن و در ۰/۵ میلی لیتر محلول DMSO حل گردید. بعد از حل شدن کامل عصاره، حجم محلول با سرم فیزیولوژی استریل به ۲ml رسانده شد تا غلظت ۴۰۰ mg/ml بدست آید. سپس رقت های ۱۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ از رقت مذکور تهیه گردید (با توجه به اینکه رقت های تهیه شده مجدداً توسط سوسپانسیون پروتواسکولکس ها به میزان ۱/۲ رقیق می شوند، لذا یک رقت بالاتر تهیه گردید).

روش انجام آزمایش آپوپتوزیس بر اساس کیت : Cell Death Detection ELISA^{PLUS} (Roche)

محتویات کیت (Kit Contents):

| ویال / بطری رنگ | برچسب | محتویات / کاربرد |
|-----------------------|---|---|
| ۱ قرمز | Anti-Histone-Biotin | <ul style="list-style-type: none"> • آنتی بادی مونوکلونال تهیه شده از موش (clone H11-4) • کونژوگه شده با بیوتین • لیوفلیزه • پایدار • جهت متصل شدن به اجزای هیستون و تشکیل کمپلکس ایمنی با بیوتین در میکروپلیت |
| ۲ سفید | Anti-DNA-POD ¹ | <ul style="list-style-type: none"> • آنتی بادی مونوکلونال تهیه شده از موش (clone MCA-33) • کونژوگه شده با پراکسیداز • لیوفلیزه • پایدار • جهت متصل شدن به قطعات DNA و ایجاد واکنش رنگی با سبوسترای ABTS |
| ۳ آبی | Positive Control | <ul style="list-style-type: none"> • کمپلکس DNA-Histone • لیوفلیزه • پایدار |
| ۴ سبز | بافر انکوباسیون | <ul style="list-style-type: none"> • ۱۰۰ میلی لیتر • آماده مصرف |
| ۵ قرمز | بافر لیز کننده | <ul style="list-style-type: none"> • ۱۰۰ میلی لیتر • آماده مصرف |
| ۶ بی رنگ | بافر سبوسترا | <ul style="list-style-type: none"> • ۱۵ میلی لیتر • آماده مصرف • برای حل کردن قرص های ABTS |
| ۷ سفید | سبوسترای آنزیم پراکسیداز ABTS ² Substrate Tablet | <ul style="list-style-type: none"> • ۳ قرص • هر کدام برای تهیه ۵ میلی لیتر محلول سبوسترا |
| ۸ بی رنگ | محلول متوقف کننده ABTS | <ul style="list-style-type: none"> • ۱۰۰ میلی لیتر • جهت متوقف کردن واکنش رنگی سبوسترای ABTS |
| ۹ | میکروپلیت | <ul style="list-style-type: none"> • ۱۲ ردیف میکروپلیت (هر کدام حاوی ۸ چاهک) • کوت شده با استرپتو آویدین |

¹- Anti-DNA Peroxidase

² ABTS Tablets are used as substrates in enzyme immunoassays with horseradish peroxidase as a marker enzyme

| | | |
|----|----------------------------|--|
| ۱۰ | چسب برای پوشاندن میکروپلیت | <ul style="list-style-type: none"> • ۴ ورق چسب پوشاننده • جهت پوشاندن میکرو پلیت |
|----|----------------------------|--|

۱- پودر لیوفلیزه Anti- Histone Biotin با در قرمز (آنتی بادی مونوکلونال تهیه شده از موش clone H11-4 که با بیوتین کونژوگه شده).

۲- پودر لیوفلیزه Anti-DNA POD (آنتی بادی مونوکلونال تهیه شده از موش clone MCA-33 که با پراکسیداز کونژوگه شده).

۳-کنترل مثبت

۴- محلول انکوباسیون (Incubation Buffer)

۵- محلول لیز کننده (Lysis Buffer)

۶- محلول سوبسترا (Substrate Buffer)

۷- ABTS Tablets سوبسترای آنزیم پراکسیداز که به صورت قرص در کیت تعبیه شده است و در هنگام آزمایش باید در ۵ میلی لیتر محلول سوبسترا حل شود.

۸- محلول متوقف کننده (ABTS Stop Solution)

۹- میکروپلیت

۱۰- چسب برای پوشاندن میکروپلیت

آماده کردن محلول های کار (Working solutions):

| شرایط نگهداری | مورد استفاده | آماده سازی | (ویال) محتویات |
|---|-------------------------|--|-------------------------|
| در دمای ۲ تا ۸ درجه دو ماه پایدار است. | قسمتی از محلول ایمنی | در ۴۵۰ لاندا آب مقطر دو بار تقطیر حل و کاملاً مخلوط شد. | Anti-Histone Biotin (۱) |
| در دمای ۲ تا ۸ درجه دو ماه پایدار است. | قسمتی از محلول ایمنی | در ۴۵۰ لاندا آب مقطر دو بار تقطیر حل و کاملاً مخلوط شد. | Anti-DNA POD (۲) |
| در دمای ۲ تا ۸ درجه دو ماه پایدار است. | ELISA مرحله ۱ | در ۴۵۰ لاندا آب مقطر دو بار تقطیر حل و کاملاً مخلوط شد. | Positive Control (۳) |
| ۱ ماه دور از نور و دمای ۲ تا ۸ درجه پایدار است. | ELISA مرحله ۵ | هر قرص ABTS در ۵ml محلول سوبسترا (ویال ۶) حل شد | ABTS Tablets (۷) |
| در دمای ۲ تا ۸ درجه قبل از تاریخ مصرف، پایدار است. | ELISA مرحله ۶ | آماده مصرف (در صورت کدر بودن باید در ۳۷ درجه قرار گیرد). | ABTS Stop Solution (۸) |

۱- Anti-Histone Biotin (پودر لیوفلیزه آنتی هیستون بیوتین + ۴۵۰ لاندا آب مقطر دو بار تقطیر)

۲- Anti-DNA POD (پودر لیوفلیزه Anti-DNA POD + ۴۵۰ لاندا آب مقطر دو بار تقطیر)

۳- Positive Control (پودر لیوفلیزه کنترل مثبت + ۴۵۰ لاندا آب مقطر دو بار تقطیر)

مواد فوق ۱۰ دقیقه کاملاً مخلوط شدند.

۴- محلول ABTS (بسته به تعداد نمونه ها هر قرص ABTS در ۵ ml محلول سوبسترا حل شد. پایداری این

محلول در تاریکی ۱ ماه است).

۵- محلول ایمنی (Immunoreagent): (۱ حجم Anti-DNA POD + ۱ حجم Anti-Histone Biotin)

+ ۱۸ حجم از محلول انکوباسیون). این محلول باید تازه تهیه شود (تصویر ۱۳).

۶ - کنترل منفی : از پروتواسکولکس های بدون مواجهه با دارو بعنوان کنترل منفی استفاده شد.

۷- نمونه مورد آزمایش : از فراکشن های سیتو پلاسمیک ناشی از لیز پروتواسکولکس ها بعد از مواجهه با گیاه دارویی مورد استفاده گردید. برای تهیه این فراکشن ها، تعداد پروتواسکولکس ها در لوله فالتونی که از قبل تهیه شده بود، شمارش شد و به تعداد ۱۰۰۰۰ سلول در میلی لیتر تنظیم گردید. به طوریکه ۱۰۰ میکرولیتر از این سوسپانسیون حاوی ۱۰۰۰ عدد پروتواسکولکس بود. تعداد ۱۰ عدد میکروتیوب برای ۳ رقت از دارو و کنترل ها لیل گذاری شد. سپس در همه آنها ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون پروتواسکولکس آماده شده، ریخته شد. در مرحله بعد، ۱۰۰ لاندا از رقت های تهیه شده گیاه دارویی مورد و کنترل مثبت اضافه شد. در کنترل منفی ۱۰۰ لاندا محیط کشت RPMI اضافه گردید. میکروتیوب ها کاملاً مخلوط شده و به مدت ۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه و در مجاورت ۵٪ CO₂ انکوبه شدند. بعد از این مرحله میکروتیوب ها سانتریفیوژ شده و محلول رویی دور ریخته شد. پروتواسکولکس ها ۳ بار با محلول PBS شستشو داده شدند تا بقایای عصاره گیاهی کاملاً از محیط خارج شود سپس مقدار ۲۰۰ لاندا Lysis Buffer به رسوب باقیمانده، اضافه و به مدت ۳۰ دقیقه در ظرف حاوی یخ انکوبه شدند. در مرحله بعد مجدداً سانتریفیوژ بعمل آمده و محلول رویی در میکروتیوب های مشخص شده برای آزمایش الایزا جدا شدند. این نمونه ها پایداری کمی داشته، لذا در هنگام آزمایش در یخ قرار گرفته و سریعاً طبق مراحل زیر آزمایش شدند.



تصویر ۱۳: کیت تشخیص مرگ سلولی از طریق آپوپتوزیس (Roche) *Cell Death Detection ELISA^{PLUS}*

روش انجام آزمایش الایزا جهت بررسی آپوپتوزیس:

- ۱- ۲۰ لاندا از نمونه های آماده شده از مرحله قبل و همچنین ۲۰ لاندا از کنترل مثبت و منفی در چاهک های میکروپلیت الایزا ریخته شد.
- ۲- سپس ۸۰ لاندا از Immunoreagent آماده، به آن اضافه گردید. روی میکروپلیت با برچسب مخصوص پوشانده شده و روی شیکر با ۳۰۰ دور در دقیقه، برای مدت ۲ ساعت در دمای اتاق انکوبه شد.
- ۳- بعد از پایان انکوباسیون، محلول رویی تخلیه و ۳ مرتبه با محلول شماره ۴ شستشو داده شد.
- ۴- ۱۰۰ لاندا از محلول ABTS به چاهک ها اضافه شده و میکروپلیت، روی شیکر با ۲۵۰ دور در دقیقه به مدت ۲۰ دقیقه انکوبه شد. بعد از انکوباسیون، در این مرحله تغییر رنگ در چاهک ها مخصوصا در چاهک کنترل مثبت مشاهده شد. در یک چاهک، فقط ۱۰۰ لاندا از محلول ABTS بعنوان بلانک ریخته شد.
- ۵- ۱۰۰ لاندا محلول متوقف کننده ABTS به چاهک ها اضافه شد.

۶- سپس جذب نوری چاهک ها در طول موج ۴۰۵ نانومتر در مقابل بلانک قرائت شد.

* تمام مراحل فوق ۳ بار در زمان های مختلف و هر بار به صورت دو تایی تکرار و نتایج ثبت گردید.

روش اندازه گیری فعالیت کاسپاز ها ۳، ۸ و ۹ بر اساس کیت های شرکت **abcam** محتویات کیت ها و آماده کردن محلول ها :

۱- Cell Lysis Buffer : آماده مصرف بوده و قبل از مصرف به دمای اتاق رسانده شد.

۲- Reaction Buffer : آماده مصرف بوده و قبل از مصرف به دمای اتاق رسانده شد.

۳- سوپسترای اختصاصی کاسپاز ها : که در دمای ۲۰- سانتی گراد پایدار بوده و در موقع آزمایش Aliquot گردیده و به اندازه مصرف برداشته شد و بقیه مجدداً به فریزر برگردانده شد.

- سوپسترای اختصاصی کاسپاز ۳ (DEVD-p-NA^۱)

- سوپسترای اختصاصی کاسپاز ۸ (IEHD-p-NA^۲)

- سوپسترای اختصاصی کاسپاز ۹ (LEHD-p-NA^۳)

۳- DTT^۴ ۱مولار: که بعد از باز شدن کیت، به مقدار ۱۰ لاندا در هر میکروتیوب Aliquot شد و بقیه مجدداً به فریزر ۲۰- درجه منتقل گردید.

۴- Dilution buffer : آماده مصرف بوده و در دمای ۴ درجه سانتی گراد پایدار است.

اصول اندازه گیری در کیت های مذکور مشابه بوده و بر اساس خاصیت پروتئازی کاسپاز ها استوار است به طوری که هر کاسپاز فقط می تواند ماده پارا نیتروآنیلین را از سوپسترای اختصاصی خود جدا کند. پارا نیتروآنیلین در طول موج ۴۰۰ یا ۴۰۵ نانومتر دارای جذب نوری است و افزایش جذب نوری در مقابل کنترل

^۱- Asp / D ,Glu / E, Val / V, Asp / D amino acids attached to Para-nitroanilin

^۲- Ile / I , Glu / E , Thr / T ,Asp/D amino acids attached to Para-nitroanilin

^۳- Leu / L, Glu / E, His / H, Asp/D amino acids attached to Para-nitroanilin

^۴- Dithiothreitol (Reducing agent)

منفی نشان دهنده افزایش فعالیت کاسپاز می باشد. برای اندازه گیری فعالیت کاسپاز ها، مراحل تهیه نمونه ها همانند روش آپوپتوزیس انجام گردید. اما به علت نیاز به مقادیر بیشتری از نمونه حاصل از لیز پروتواسکولکس ها، حجم سوسپانسیون سلولی و رقت های مختلف گیاه دارویی مورد به همان نسبت بیشتر در نظر گرفته شد. یعنی ۵۰۰ لاندا از سوسپانسیون پروتواسکولکس که حاوی ۵۰۰۰ سلول بود با ۵۰۰ لاندا از رقت های مختلف گیاه دارویی مورد مجاور شده و به مدت ۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه حاوی ۵٪ CO_2 قرار داده شد. بعد از انکوباسیون، مراحل آزمایش به شرح زیر و بر اساس دستورالعمل کیت ادامه پیدا کرد:

۱- بعد از پایان انکوباسیون، میکروتیوب ها با RCF، g ۲۰۰ و به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شده و محلول رویی دور ریخته شد. پروتواسکولکس ها ۳ بار با PBS شستشو گردید، سپس ۵۰ لاندا بافر لیز کننده سرد روی آنها اضافه شده و بعد از مخلوط کردن، ۱۰ دقیقه روی یخ انکوبه شدند.

۲- بعداً با دور g ۱۰۰۰۰ به مدت ۱ دقیقه سانتریفیوژ انجام شد.

۳- بعد از سانتریفیوژ، محلول رویی سریعاً جدا شده و در یخ قرار داده شد.

۴- تعداد ۱۰ چاهک الایزا انتخاب و لیبل گذاری گردید. سپس ۵۰ لاندا از نمونه های بدست آمده و کنترل منفی به صورت دو تایی داخل آنها ریخته شد. برای حذف رنگ زمینه، در یک چاهک ۵۰ لاندا Reaction Buffer اضافه گردید.

۵- مقدار مورد نیاز محلول واکنش (Reaction Mix)، به نسبت ۵۰ لاندا Reaction Buffer و ۰/۵ لاندا DTT در نظر گرفته شد.

۶- ۵۰ لاندا از محلول آزمایش (Reaction Mix)، در هر چاهک ریخته شد.

۷- ۵ لاندا از سوپسترای اختصاصی هر کاسپاز به چاهک ها اضافه شد.

۸- پس از مخلوط کردن محتویات چاهک ها، چاهک های مذکور به مدت ۲ ساعت در ۳۷ درجه انکوبه شدند.

۹- در نهایت، نتایج در طول موج ۴۰۵ نانومتر الایزا قرائت و نتایج مذکور ثبت گردید.

ASSAY SUMMRY

خلاصه اندازه گیری

فعال شدن کاسپازهای ۳، ۸ و ۹ در نمونه ها (Induce caspase3,8 & 9 activation in test sample)



آماده کردن نمونه ها (Sample preparation)



اضافه کردن محلول واکنش و سوپسترای اختصاصی هر کاسپاز

Caspase 3 : Add 2X reaction buffer/DTT and DEVD-pNA

Caspase 8 : Add 2X reaction buffer/DTT and IETD-pNA

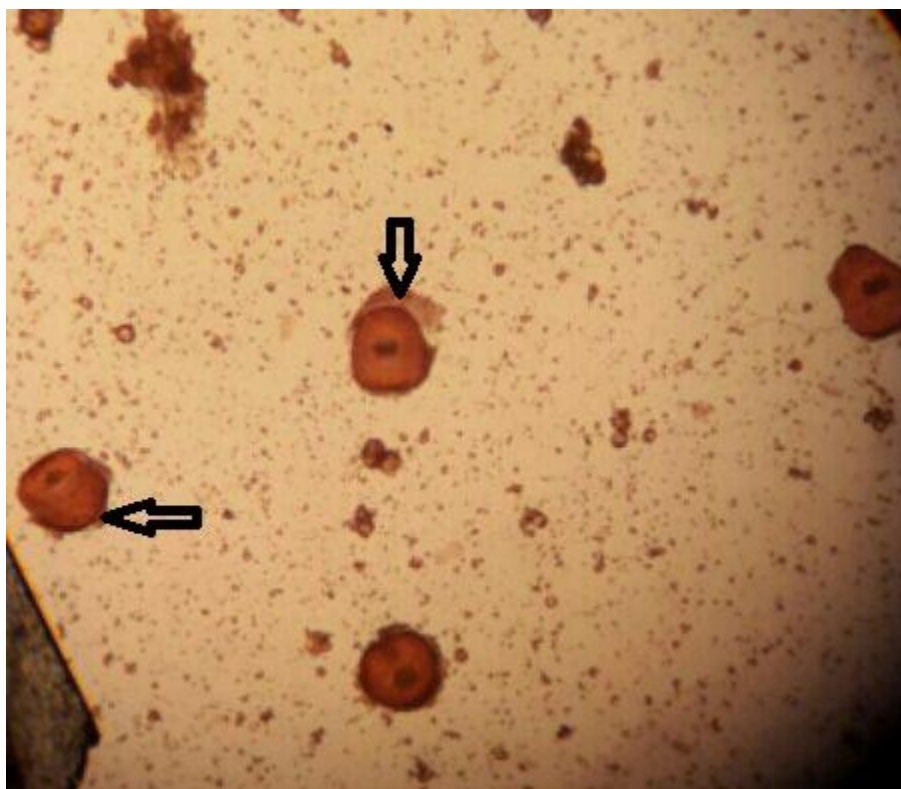
Caspase 9 : Add 2X reaction buffer/DTT and LEHD-p-NA



۱-۲ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه (Incubate 37°C for 1 – 2 hours)



اندازه گیری جذب نوری در طول موج ۴۰۰-۴۰۵ نانومتر Measure optical density (OD400 nm)



تصویر ۱۴: پروتواسکولکس های مرده کیست هیداتید بعد از مواجهه با عصاره گیاه مورد

فصل پنجم

یافته ها

در این مطالعه اثر آپتوتیک گیاه مورد با غلظت های ۵، ۵۰ و ۱۰۰ در مدت ۴ ساعت و در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد، روی پروتواسکولکس های کیست هیداتید بررسی شد. همچنین اثر گیاه مذکور در رقت ها و شرایط فوق، در افزایش فعالیت کاسپاز های ۳، ۸ و ۹ از پروتواسکولکس های کیست هیداتید، مورد بررسی قرار گرفت. از سوسپانسیون حاوی پروتواسکولکس ها در محیط کشت RPMI، بدون مواجهه با عصاره گیاه، به عنوان کنترل منفی استفاده شد. آزمایش ۳ بار و هر بار به صورت دوتایی تکرار شد. نتایج در جداول ۴ تا ۷ و نمودار های ۱ تا ۸ خلاصه شده است.

چنانکه در جدول ۴ مشخص است، گیاه مورد در تمامی رقت های مورد استفاده دارای اثر آپتوتیک بر روی پروتواسکولکس ها بود که این اثر در مقایسه با کنترل منفی فقط در غلظت های ۵۰ mg/ml و ۱۰۰ و به ترتیب به میزان ۴۶/۶۵ و ۵۵/۲۶ درصد معنی دار بود ($P < 0.05$). همچنین نمودار های ۱ و ۲ افزایش معنی دار میانگین جذب نوری و افزایش درصد آپتوزیس در پروتواسکولکس های مواجهه شده با رقت های مذکور (۵۰ و ۱۰۰ mg/ml) از عصاره گیاه مورد را تایید می کند ($P < 0.05$).

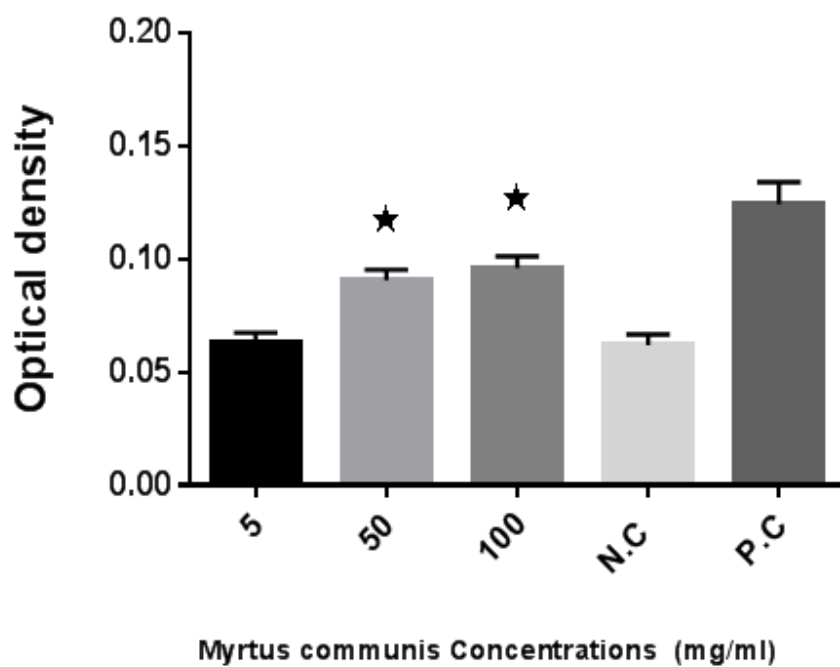
جدول ۴ : اثر آپتوتیک غلظت های مختلف عصاره گیاه مورد بر روی پروتواسکولکس های کیست هیداتید

| درصد آپتوز | انحراف معیار (SD) \pm میانگین جذب نوری | تعداد تست | غلظت عصاره (mg/ml) |
|------------|--|-----------|--------------------|
| ۱/۳۱ | 0.004749 ± 0.0627 | ۶ | ۵ |
| * ۴۶/۶۵ | 0.004596 ± 0.09076 | ۶ | ۵۰ |
| * ۵۵/۲۶ | 0.005211 ± 0.09611 | ۶ | ۱۰۰ |
| ۱ | 0.004696 ± 0.06200 | ۶ | N.C ¹ |
| ۱۰۰ | 0.009687 ± 0.1244 | ۶ | P.C ² |

1-Negative control (Protoscolices without exposure to the extract)

2- Positive control (Available in kit)

* Compared with negative control ($p < 0.05$)



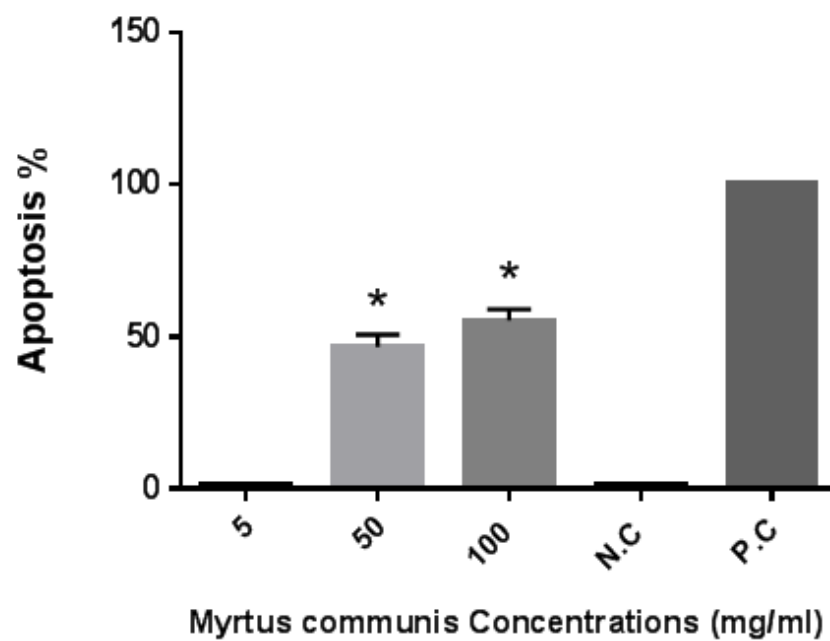
1-Negative control (Protoscolices without exposure to the extract)

2- Positive control (Available in kit)

*(Compared with negative control ($p < 0.05$))

نمودار ۱: اثر آپوپتوتیک عصاره گیاه مورد بررسی پروتواسکولکس های کیست هیداتید بر اساس میزان جذب

نوری نمونه ها در مقایسه با کنترل منفی



1-Negative control (Protoscolices without exposure to the extract)

2- Positive control (Available in kit)

*(Compared with negative control ($p < 0.05$))

نمودار ۲: اثر آپوپتوتیک عصاره گیاه مورد بررسی پروتواسکولکس های کیست هیداتید در مقایسه با کنترل منفی بر حسب درصد

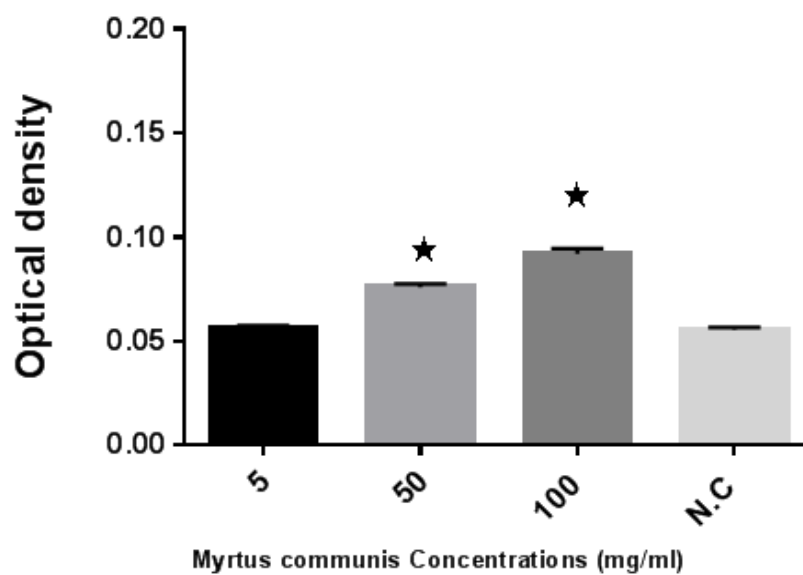
در بررسی اثر رقت های مختلف گیاه مورد (۵ mg/ml ، ۵۰ و ۱۰۰) در افزایش فعالیت کاسپاز های ۳، ۸ و ۹ از پروتواسکولکس های تحت تاثیر عصاره مذکور، مشخص گردید که فعالیت کاسپاز ۳ در تمام غلظت های مورد استفاده از گیاه، افزایش یافت که این افزایش فقط در غلظت های ۵۰ mg/ml و ۱۰۰ به ترتیب با ۳۷ و ۶۶/۱۹ درصد معنی دار بود ($P < 0.05$) (جدول ۵). همچنین نمودار های شماره ۳ و ۴ افزایش معنی دار میانگین جذب نوری و افزایش درصد فعالیت کاسپاز ۳ در پروتواسکولکس های مواجه شده با رقت های مذکور (mg/ml ۵۰ و ۱۰۰) از عصاره گیاه مورد را تایید می کند ($P < 0.05$).

جدول ۵: اثر غلظت های مختلف عصاره گیاه مورد بر روی پروتواسکولکس های کیست هیداتید، در افزایش فعالیت کاسپاز ۳

| درصد افزایش فعالیت کاسپاز ۳ | انحراف معیار (SD) \pm میانگین جذب نوری | تعداد تست | غلظت عصاره (mg/ml) |
|-----------------------------|--|-----------|--------------------|
| ۱/۲۴ | 0.001196 ± 0.0559 | ۶ | ۵ |
| ۳۷* | 0.001422 ± 0.07575 | ۶ | ۵۰ |
| ۶۶/۱۹* | 0.00244 ± 0.0919 | ۶ | ۱۰۰ |
| ۱ | 0.001178 ± 0.0553 | ۶ | N.C ¹ |

1-Negative control (Protoscolices without exposure to the extract)

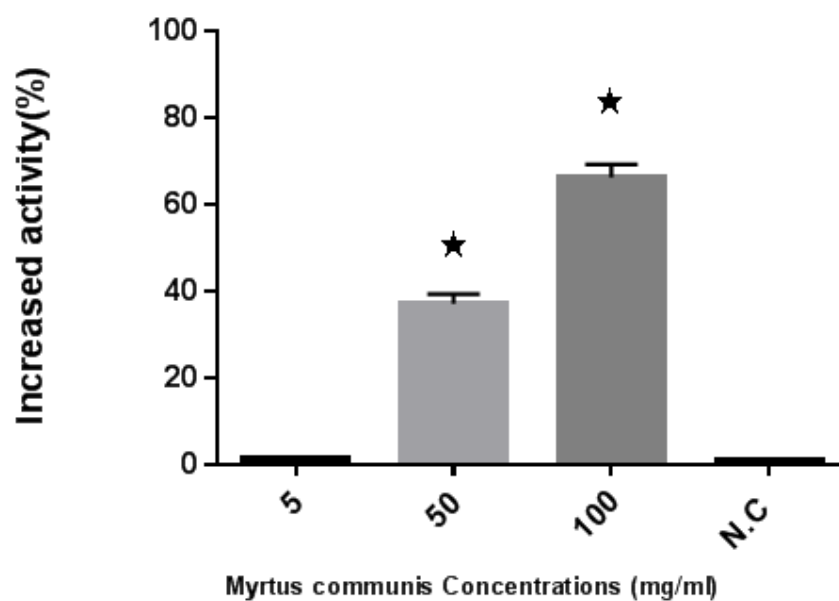
*(Compared with negative control (p<0.05)



1-Negative control (Protoscolices without exposure to the extract)

*(Compared with negative control ($p < 0.05$))

نمودار ۳: اثر عصاره گیاه مورد بر روی پروتواسکولکس های کیست هیداتید، در افزایش فعالیت کاسپاز ۳ بر حسب جذب نوری



1-Negative control (Protoscolices without exposure to the extract)

*(Compared with negative control ($p < 0.05$))

نمودار ۴: اثر عصاره گیاه مورد بر روی پروتواسکولکس های کیست هیداتید، در افزایش فعالیت کاسپاز ۳ بر حسب درصد

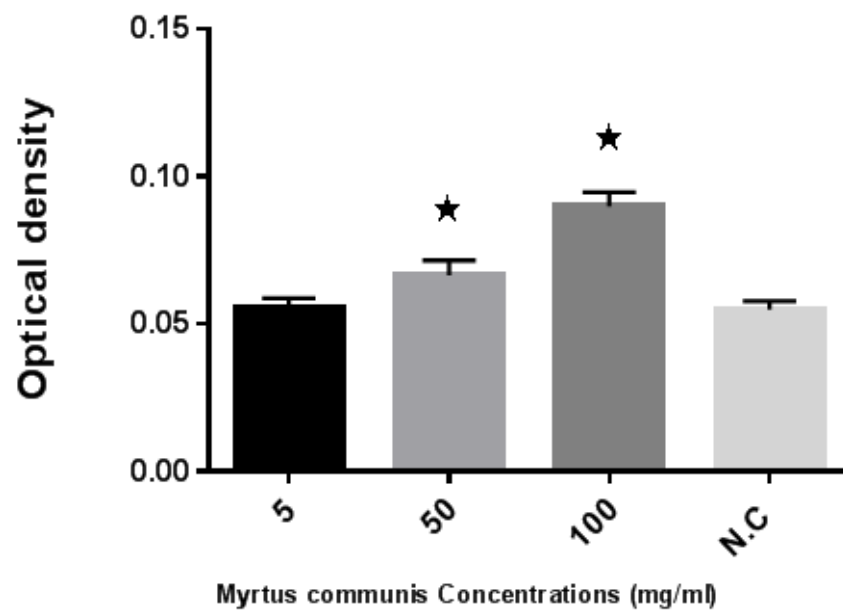
فعالیت کاسپاز ۹ در اثر تاثیر غلظت های مختلف عصاره گیاه مورد بر روی پروتواسکولکس ها، باز افزایش داشت که این اثر، فقط در غلظت های ۵۰ و ۱۰۰ mg/ml و در مقایسه با کنترل منفی، به ترتیب با ۲۰/۸۹ و ۶۳/۶۹ درصد، معنی دار بود ($P < 0.05$) (جدول ۶). نمودار های ۵ و ۶ نیز نشان می دهد که افزایش جذب نوری و افزایش درصد فعالیت کاسپاز ۹ در پروتواسکولکس ها ی مواجه شده با عصاره گیاه مورد، فقط در غلظت های mg/ml ۵۰ و ۱۰۰ معنی دار بود ($P < 0.05$).

جدول ۶: اثر غلظت های مختلف عصاره گیاه مورد بر روی پروتواسکولکس های کیست هیداتید، در افزایش فعالیت کاسپاز ۹

| درصد افزایش فعالیت کاسپاز ۹ | انحراف معیار (SD) \pm میانگین جذب نوری | تعداد تست | غلظت عصاره (mg/ml) |
|-----------------------------|--|-----------|--------------------|
| ۱/۴۹ | 0.00287 ± 0.05565 | ۶ | ۵ |
| ۲۰/۸۹ * | 0.005144 ± 0.06635 | ۶ | ۵۰ |
| ۶۳/۶۹ * | 0.00479 ± 0.08973 | ۶ | ۱۰۰ |
| ۱ | 0.00287 ± 0.0548 | ۶ | N.C ¹ |

1-Negative control (Protoscolices without exposure to the extract)

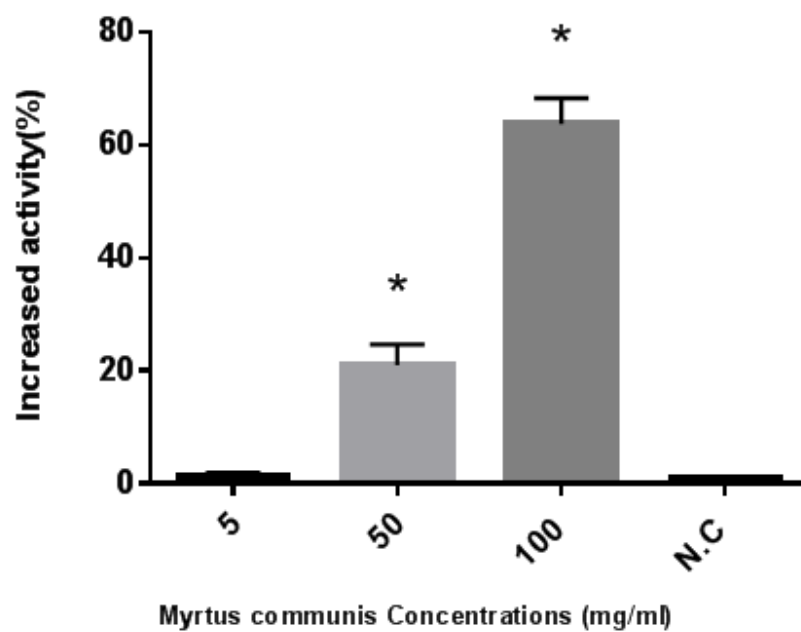
* Compared with negative control ($p < 0.05$)



1-Negative control (Protoscolices without exposure to the extract)

* Compared with negative control ($p < 0.05$)

نمودار ۵: اثر عصاره گیاه مورد بر روی پروتواسکولکس های کیست هیداتید، در افزایش فعالیت کاسپاز ۹ بر حسب جذب نوری



1-Negative control (Protoscolices without exposure to the extract)

* Compared with negative control ($p < 0.05$)

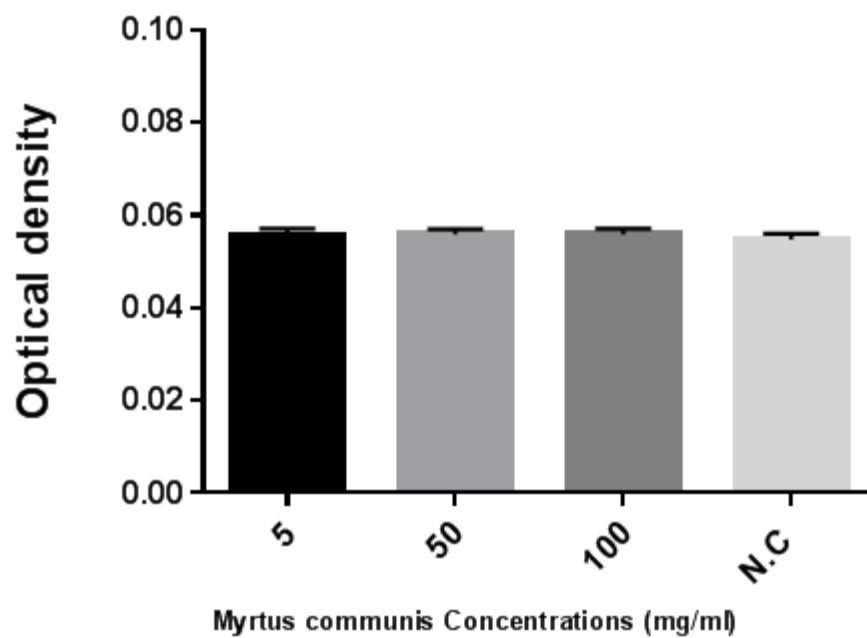
نمودار ۶: اثر عصاره گیاه مورد بر روی پروتواسکولکس های کیست هیداتید، در افزایش فعالیت کاسپاز ۹ بر حسب درصد

در بررسی اثر رقت های مختلف گیاه مورد (۵ mg/ml، ۵۰ و ۱۰۰) بر روی پروتواسکولکس های کیست هیداتید، برای بررسی افزایش فعالیت کاسپاز ۸، هیچکدام از غلظت های مذکور، افزایش قابل ملاحظه ای در فعالیت کاسپاز ۸ ایجاد نکردند (جدول ۷) ($P=0/6331$). این وضعیت همچنین در برحسب تغییرات جذب نوری و تغییر درصد فعالیت کاسپاز ۸ به ترتیب در نمودار های ۷ و ۸ نشان داده شده است.

جدول ۷: اثر عصاره گیاه مورد بر روی پروتواسکولکس های کیست هیداتید، در افزایش فعالیت کاسپاز ۸

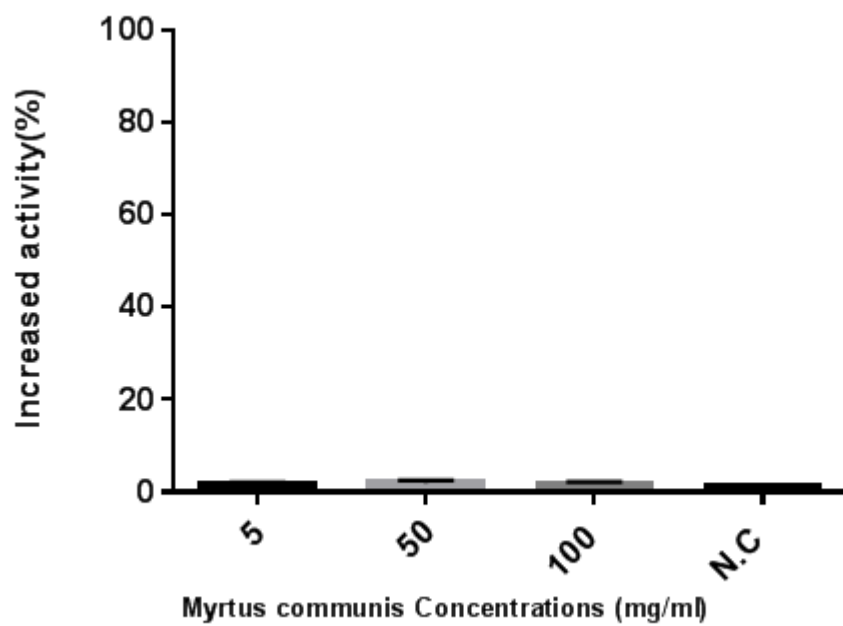
| درصد افزایش فعالیت کاسپاز ۸ | انحراف معیار (SD) \pm میانگین جذب نوری | تعداد تست | غلظت عصاره (mg/ml) |
|-----------------------------|--|-----------|--------------------|
| ۱/۶۴ | $0/001397 \pm 0/0557$ | ۶ | ۵ |
| ۱/۹۵ | $0/00109 \pm 0/0558$ | ۶ | ۵۰ |
| ۲/۰۱ | $0/001212 \pm 0/0559$ | ۶ | ۱۰۰ |
| ۱ | $0/001258 \pm 0/0547$ | ۶ | N.C ¹ |

1-Negative control (Protoscolices without exposure to the extract)



1-Negative control (Protoscolices without exposure to the extract)

نمودار ۷: اثر عصاره گیاه مورد بر روی پروتواسکولکس های کیست هیداتید در افزایش فعالیت کاسپاز ۸ بر حسب جذب نوری



1-Negative control (Protoscolices without exposure to the extract)

نمودار ۸: اثر عصاره گیاه مورد بر روی پروتواسکولکس های کیست هیداتید در افزایش فعالیت کاسپاز ۸ بر حسب درصد

با استفاده از تست Tukey اثر مقایسه ای آپوتوتیک غلظت های مختلف گیاه مورد (۵، ۵۰ و ۱۰۰ mg/ml) و همچنین اثر مقایسه ای غلظت های مذکور در افزایش فعالیت کاسپاز های ۳، ۸ و ۹ در پروتواسکولکس های کیست هیداتید مواجه شده با گیاه فوق، مورد بررسی قرار گرفت. همانطور که جداول شماره ۸ تا ۱۱ نشان می دهند، وقتی اثر هر کدام از غلظت ها در القاء آپوتوزیس و همچنین افزایش فعالیت کاسپاز های مورد مطالعه از پروتواسکولکس ها مقایسه شد، ۱ تا ۴ گروه همگنی مشاهده شدند که این گروه ها ارتباطشان با همدیگر معنی دار نبود ولی این ارتباط در مقایسه با گروه های دیگر معنی دار بود.

جدول ۸ : اثر مقایسه ای آپوتوتیک غلظت های مختلف عصاره گیاه مورد بر روی پروتواسکولکس های کیست هیداتید با استفاده از تست Tukey

| غلظت (mg/ml) | تعداد تست | گروه های همگنی در سطح معنی داری ($p < 0.05$) | |
|--------------|-----------|--|------------------------|
| | | 1 | 2 |
| Neg.control | 6 | .062 | .090767 .096117 |
| 5 | 6 | .0627 | |
| 50 | 6 | | |
| 100 | 6 | | |
| P-value | | .8026 | .171 |

جدول ۹ : اثر مقایسه ای غلظت های مختلف عصاره گیاه مورد بر روی پروتواسکولکس ها ی کیست هیداتید، در افزایش فعالیت کاسپاز ۳ با استفاده از تست Tukey

| غلظت (mg/ml) | تعداد تست | گروه های همگنی در سطح معنی داری ($p < 0.05$) | | | |
|--------------|-----------|--|---------|---------|---------|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 |
| Neg.control | 6 | .0553 | | | |
| 5 | 6 | | .055983 | | |
| 50 | 6 | | | .075750 | |
| 100 | 6 | | | | .091900 |
| P.vaue | | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 1.000 |

جدول ۱۰ : اثر مقایسه ای غلظت های مختلف عصاره گیاه مورد بر روی پروتواسکولکس ها ی کیست هیداتید، در افزایش فعالیت کاسپاز ۹، با استفاده از تست Tukey

| غلظت (mg/ml) | تعداد تست | گروه های همگنی در سطح معنی داری ($p < 0.05$) | | | |
|--------------|-----------|--|---------|---------|---------|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 |
| Neg.control | 6 | .0548 | | | |
| 5 | 6 | | .055650 | | |
| 50 | 6 | | | .066350 | |
| 100 | 6 | | | | .089733 |
| P.vaue | | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 1.000 |

جدول ۱۱ : اثر مقایسه ای غلظت های مختلف عصاره گیاه مورد بر روی پروتواسکولکس ها ی کیست هیداتید، در افزایش فعالیت کاسپاز ۸، با استفاده از تست Tukey

| غلظت (mg/ml) | تعداد تست | گروه های همگنی در سطح معنی داری ($p < 0.05$) |
|--------------|-----------|--|
| | | 1 |
| Neg.control | 6 | .0547 |
| 5 | 6 | .055700 |
| 50 | 6 | .055900 |
| 100 | 6 | .055965 |
| P.vaiue | | .3874 |

فصل ششم

بحث

در این مطالعه اثر آپوپتوتیک گیاه مورد با غلظت های ۵، ۵۰ و ۱۰۰ در مدت ۴ ساعت و در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد، روی پروتواسکولکس های کیست هیداتید بررسی شد. همچنین اثر گیاه مذکور در رقت ها و شرایط فوق، در افزایش فعالیت کاسپاز های ۳، ۸ و ۹ از پروتواسکولکس های کیست هیداتید، مورد بررسی قرار گرفت. از سوسپانسیون حاوی پروتواسکولکس ها در محیط کشت RPMI، بدون مواجهه با عصاره گیاه، به عنوان کنترل منفی استفاده شد. گیاه مورد در تمامی رقت های مورد استفاده دارای اثر آپوپتوتیک بر روی پروتواسکولکس ها بود که این اثر در مقایسه با کنترل منفی فقط در غلظت های ۵۰ mg/ml و ۱۰۰ معنی دار بود ($p < 0.05$). همچنین در بررسی اثر رقت های مختلف گیاه مذکور در افزایش فعالیت کاسپاز های ۳، ۸ و ۹ از پروتواسکولکس های تحت تاثیر عصاره گیاه فوق، مشخص گردید که فعالیت کاسپاز های ۳ و ۹ در تمامی غلظت های مورد استفاده از گیاه مورد، افزایش یافت که این افزایش در اینجا نیز فقط در غلظت های ۵۰ و ۱۰۰ معنی دار بود ($p < 0.05$). در صورتیکه در اثر تاثیر گیاه مورد نظر بر روی پروتواسکولکس ها، هیچگونه افزایش قابل ملاحظه ای در فعالیت کاسپاز ۸ مشاهده نگردید.

Tretiakova و همکاران در سال ۲۰۰۸ به بررسی القاء آپوپتوزیس ماده Myrtucommulone (مشتق از برگ گیاه مورد)، بر روی انواع رده های سلولهای سرطانی پرداختند (۱۳۳). نتایج تحقیقات نشان داد که ماده مذکور می تواند باعث از دست رفتن پتانسیل غشاء میتوکندری در سلولهای سرطانی مذکور و آزاد سازی سیتوکروم C از میتوکندری شده و باعث افزایش فعالیت کاسپازهای ۳ و ۹ و مرگ سلولی رده های مختلف سلولهای سرطانی از مسیر میتوکندریایی گردد، در حالیکه بر روی کاسپاز ۸ هیچ اثری را نشان نداد. در مطالعه حاضر نیز همسو با بررسی فوق، اثر القاء آپوپتوزیس بر روی پروتواسکولکس های کیست هیداتید از طریق

افزایش فعالیت کاسپازهای ۳ و ۹ مشاهده گردید و هیچگونه افزایش قابل ملاحظه ای در فعالیت کاسپاز ۸ ایجاد نشد که این تشابه اثر را می توان به وجود مشترک ماده اشاره شده در تحقیق فوق (Myrtucommulone) و عصاره گیاه مورد مطالعه ما نسبت داد.

Izgi و همکاران در سال ۲۰۱۵ به مطالعه اثر سایتوتوکسیک و آپوپتوتیک Myrtucommulone-A (یک ترکیب فعال از مشتقات گیاه مورد) در مسیرهای داخلی و خارجی ، بر روی سلولهای سرطانی پرداختند و به این نتیجه رسیدند که ترکیب مذکور می تواند باعث افزایش بیان ژنهای آپوپتوز از جمله FasL, Fas و TNF و افزایش فعالیت کاسپاز ۴ گردد و این واکنش ها را وابسته به دوز گزارش کردند. همچنین نشان دادند که ماده فوق می تواند به عنوان یک ترکیب درمانی بالقوه در مسیرهای آپوپتوز، ایفای نقش کند (۱۳۴). در بررسی ما نیز عصاره گیاه مورد توانست با افزایش فعالیت کاسپازهای ۳ و ۹ ، باعث القاء آپوپتوزیس بر روی پروتواسکولکس های کیست هیداتید نموده و مرگ سلولی برنامه ریزی شده را باعث شد و همچنین مطالعه ما همانند مطالعه فوق حاکی از وابسته بودن اثر آپوپتوتیک گیاه با دوز آن بود.

در سال ۲۰۱۶ محققین به بررسی اثرات مواد شیمیایی Epirubicin و Cisplatin به همراه Myrtucommulone-A (ترکیب فعال از گیاه مورد) بر روی سلولهای سرطانی سینه موش پرداختند و به این نتیجه رسیدند که اثرات آپوپتوتیک ترکیبات مذکور به همراه ترکیب گرفته شده از گیاه مورد، بیشتر از ترکیبات فوق (به تنهایی) بر روی سلولهای سرطانی موثر می باشد (۱۳۵) که این مسئله حاکی از اثر قابل توجه ترکیب گرفته شده از گیاه مورد در افزایش اثر آپوپتوتیک مواد شیمیایی موثر در شیمی درمانی می باشد و می تواند توجیه گر نتایج مطالعه ما از نظر تاثیر عصاره گیاه مورد در مرگ سلولی پروتواسکولکس های کیست هیداتید باشد.

در سال ۲۰۱۴ محققین به مطالعه مهار رشد و آپوپتوزیس سلول های سرطانی موش توسط عصاره متانولی اکالیپتوس (*Eucalyptus Camaldulensis*) از خانواده موردیان (*Myrtaceae*)، پرداختند. آنها از مهار

کننده های کاسپازهای ۳ و ۸ برای پی بردن به مسیر آپوپتوتیک در سلولهای سرطانی استفاده کردند. اطلاعات بدست آمده از آزمایش، نشان داد که القاء آپوپتوزیس از طریق مسیر وابسته به کاسپاز ۳ صورت گرفته است و کاسپاز ۸ نقشی در مرگ سلولی سلولهای سرطانی نداشت (۱۳۶). در مطالعه ما نیز نشان داده شد که عصاره گیاه مورد می تواند از طریق افزایش کاسپاز ۳ باعث آپوپتوز پروتواسکولکس ها شده و مرگ سلولی را در پی داشته باشد که این مسئله می تواند توجیه گر وجود ترکیبات مشابه در عصاره گیاه مورد بررسی فوق (اکالیپتوس) و گیاه مورد مطالعه ما به جهت هم خانواده بودن داشته باشد. مشابه تحقیق فوق در بررسی ما نیز عصاره گیاه مورد مطالعه، هیچگونه افزایشی در فعالیت کاسپاز ۸ نداشت.

برخی از محققین در سال ۲۰۱۲ به بررسی فعالیت ضد تکثیری و آپوپتوتیک عصاره اتیل استاتی یک نوع اکالیپتوس به نام *Eucalyptus Citridora* از خانواده موردیان (*Myrtaceae*) و یک ترکیب مهم بیواکتیو آن (ترکیب فلاوانولی)، بر روی سلولهای ملانوما پرداختند. محققین فوق اثرات ضد تکثیری عصاره اتیل استاتی گیاه فوق و ترکیب فلاوانولی آن را نشان دادند و گزارش کردند که عصاره و ترکیب بیواکتیو گیاه مذکور می تواند باعث کاهش پتانسیل غشاء میتوکندری سلولهای مورد مطالعه و افزایش بیان نسبت BAX/Bcl-2 و همچنین افزایش فعالیت کاسپاز ۳ شوند و متعاقب آن باعث مرگ سلولی و القاء آپوپتوزیس بر روی سلولهای ملانوما شوند (۱۳۷). در تحقیق ما نیز عصاره گیاه مورد توانست با افزایش فعالیت کاسپاز ۳ باعث القاء آپوپتوزیس بر روی پروتواسکولکس های کیست انگل شود که آن را می توان به وجود ترکیبات فلاوانولی مشابه در گیاه مورد مطالعه ما و گیاه فوق (هم خانواده گیاه مورد) نسبت داد.

برخی از پژوهشگران با مطالعه و جداسازی یک فلاونوئید بنام کامفرول (*Kaempferol*)، یکی از مشتقات گونه های اکالیپتوس (*Eucalyptos occidentalis*) و تاثیر آن بر روی سلول های سرطانی میلوئیدی، به این نتیجه رسیدند که ماده مذکور می تواند باعث تغییرات مورفولوژیک، قطعه قطعه شدن DNA و مرگ سلولی برنامه ریزی شده توسط افزایش فعالیت کاسپاز های ۳ و ۸ و آزاد سازی سیتوکروم C از میتوکندری گردد

(۱۳۸). در بررسی ما نیز اثر آپوتوتیک عصاره گیاه مورد بر روی پروتواسکولکس ها با افزایش فعالیت کاسپاز ۳ همراه بود ولی برخلاف تحقیق فوق، در بررسی ما عصاره گیاه مورد مطالعه هیچگونه تاثیری در افزایش کاسپاز ۸ نداشت که این مسئله می تواند احتمالا مربوط به نوع گیاه یا ترکیبات مختلف موجود در آن و سلولهای مورد مواجهه با گیاه فوق الذکر باشد.

Islam و همکاران در سال ۲۰۱۵ به بررسی اثرات آپوتوتیک ماده (p-menth-1-ene-4,7-diol (EC-1) که مشتق از یکی از گونه های اکالیپتوس به نام *Eucalyptus camaldulensis Dhnh* از خانواده موردیان (*Myrtaceae*) می باشد، بر روی سلولهای سرطانی Ehrlich پرداختند. آنها برای بررسی آپوتوزیس، از میکروسکوپ ایمونوفلوروسنت، آزمون قطعه قطعه شدن DNA، فلوسایتومتری و همچنین PCR برای بررسی بیان ژن های آپوتوتیک استفاده کردند. نتایج حاصل نشان داد که ماده مذکور (EC-1) می تواند باعث بیان ژن های مرتبط با آپوتوزیس در سلول سرطانی تحت مطالعه باشد. بعلاوه گزارش کردند که ماده مذکور دارای فعالیت ضد توموری وابسته به دوز بوده و می تواند به عنوان یک ترکیب ضد سرطانی و ضد تکثیری در بررسی آپوتوزیس در مدل های سلولی و موشی کاربرد داشته باشد (۱۳۹). همچنین در سال ۲۰۱۶ Jian و همکاران به بررسی اثر آپوتوتیک ماده Eucalrobusone C، که یک ترکیب جدا شده از برگ یک گونه اکالیپتوس به نام *Eucalyptus robusta* (هم خانواده با گیاه مورد) می باشد را بر روی سلولهای سرطانی کبد، با استفاده از روش فلوسایتومتری پرداختند. نتایج نشان داد که ماده مذکور (Eucalrobusone C) فعالیت ضد تکثیری قوی وابسته به غلظت و زمان بر روی سلولهای سرطانی کبد داشته و باعث القاء آپوتوزیس از طریق مسیر میتوکندری وابسته به کاسپاز، بر روی سلولهای سرطانی کبد می شود (۱۴۰). در تحقیق ما نیز نشان داده شد که عصاره گیاه مورد می تواند با افزایش فعالیت کاسپاز ها (۳ و ۹) بر روی پروتواسکولکس ها اثر آپوتوتیک داشته باشد که این مسئله می تواند حاکی از هم خانواده بودن گیاه مورد بررسی ما و گیاهان مورد مطالعه

محققین فوق و وجود ترکیبات مشابه در گیاه مورد مطالعه ما و گیاهان مورد بررسی توسط محققین فوق باشد. ضمناً در مطالعه ما نیز همسو با مطالعات فوق اثر آپوپتوتیک وابسته به دوز بود.

در سال ۲۰۰۸ برخی از محققین به مطالعه اثرات آپوپتوتیک عصاره گیاه *Syzygium cumini* از خانواده موردیان (Myrtaceae) بر روی سلولهای سرطانی دهانه رحم پرداختند. در این مطالعه از غلظت های مختلف از عصاره گیاه و مدت زمانهای متفاوت مواجهه استفاده گردید. نتایج آنها نشان داد که عصاره گیاه فوق می تواند باعث مرگ سلولی شود که این امر وابسته به غلظت و زمان بود (۱۴۱). همچنین برخی از پژوهشگران چینی در سال ۲۰۱۴ به بررسی اثرات آپوپتوتیک و مهار رشد در رده های سلولی سرطان کولون انسان، توسط عصاره اتیل استاتی گیاه (*Syzygium aromaticum*) Clove از خانواده موردیان (*Myrtacea*) و یک ترکیب بیواکتیو استخراج شده از آن بنام اولئانولیک اسید، (*Oleanolic acid*) به صورت برون تنی و درون تنی پرداختند. با توجه به نتایج حاصله گزارش کردند که عصاره گیاه مذکور و ماده استخراج شده از آن، هر دو خاصیت سایتوتوکسیک بر روی سلولهای سرطانی داشتند. همچنین متخصصین فوق با استفاد از فلوسایتومتری نشان دادند که عصاره گیاه فوق می تواند باعث توقف چرخه سلولی در فاز G0/G1 و القاء آپوپتوزیس در سلولهای مورد آزمایش شود که این اثر وابسته به غلظت بود (۱۴۲). در مطالعه حاضر نیز اثر آپوپتوتیک عصاره گیاه مورد بر روی پروتواسکولکس های کیست هیداتید و وابسته به غلظت بودن اثر مذکور می تواند با توجه به هم خانواده بودن این گیاه و گیاهان مورد مطالعه فوق به علت وجود احتمالی ترکیبات بیواکتیو مشابه (*Oleanolic acid*) در گیاه مورد مطالعه ما و گیاهان مورد مطالعه محققین فوق باشد که این مسئله نیاز به تحقیقات بیشتر دارد.

در سال ۲۰۱۳ برخی از پژوهشگران به بررسی القاء آپوپتوزیس توسط اسانس گرفته شده از گل های گیاه *Syzygium aromaticum* (از خانواده موردیان) بر روی پروماستیگوت های لیسمانیا دونووانی پرداختند و توسط gas chromatography ، وجود مواد *Eugenol* و استات *Eugenol* در اسانس مذکور را تایید

کردند. نتایج آنها نشان داد که اسانس فوق می تواند باعث خارج کردن فسفاتیدیل سرین و توقف چرخه سلولی در فاز G0/G1، کاهش پتانسیل غشاء میتوکندری و همچنین مرگ سلولی برنامه ریزی شده بر روی پروماستیگوت ها و آماستیگوت های لیشمانیا دونوانی گردد (۱۴۳). همچنین در تحقیق دیگر در سال ۲۰۱۱ برخی از محققین هندی به بررسی القاء آپوپتوزیس توسط ماده Eugenol بر روی سلولهای سرطانی کولون پرداختند. نتایج آنها نشان داد که این ماده باعث افزایش تجمع سلولها در فاز sub-G1، قطعه قطعه شدن DNA، افزایش القاء آپوپتوزیس و افزایش فعالیت کاسپاز ۳ بر روی سلولهای کولون می گردد (۱۴۴). در تحقیق ما نیز همسو با تحقیقات فوق عصاره گیاه مورد توانست باعث افزایش فعالیت کاسپاز ۳ و مرگ پروتواسکولکس های کیست هیداتید گردد. از آنجا که گیاه مورد مطالعه ما و گیاهان فوق الذکر هم خانواده هستند، لذا می توان اثرات مشابه آپوپتوتیک را به وجود احتمالی ترکیبات مشابه از جمله Eugenol در گیاه مورد مطالعه ما و گیاهان مورد بررسی محققین فوق نسبت داد که با توجه به اختلاف سلولهای مورد مواجهه در بررسی حاضر و بررسی های فوق و همچنین تنوع ترکیبات احتمالی موجود در اسانس و عصاره ما، نیاز به تحقیقات بیشتری می باشد.

در سال ۲۰۱۱ Bontempo و همکاران به بررسی اثرات ضد سرطانی و آپوپتوتیک عصاره *Psidium guajava L.* (از خانواده موردیان) بر روی سلولهای سرطانی پرومیلوسیت پرداختند. نتایج آنها نشان داد که عصاره گیاه مذکور فعالیت ضد تکثیری داشته و همچنین باعث القاء آپوپتوزیس، افزایش فعالیت کاسپاز های ۸ و ۹، افزایش بیان TNF، FasL و پروتئین پروآپوپتوتیک (BAD) بر روی سلولهای سرطانی شده (۱۴۵). در مطالعه ما نیز گیاه مورد دارای اثرات آپوپتوتیک قابل ملاحظه بر روی پروتواسکولکس های کیست هیداتید بود و همچنین فعالیت کاسپاز ۹ را به مقدار معنی دارای افزایش داد. اما برخلاف مطالعه فوق، هیچ اثری در افزایش فعالیت کاسپاز ۸ نداشت که این اختلاف اثر می تواند علیرغم هم خانواده بودن گیاه مورد مطالعه ما و گیاه فوق

مربوط به جنس و گونه گیاه و همچنین ترکیبات مختلف موجود در آنها و سلولهای مورد مواجهه با عصاره یا اسانس گیاهان مذکور باشد که نیاز به تحقیق بیشتر دارد.

Pascoal و همکاران در سال ۲۰۱۴ به بررسی فعالیت ضد تکثیری و القاء آپوپتوزیس عصاره اتانولی استخراج شده از گیاه *Campomanesia adamantium* (از خانواده موردیان) بر روی سلولهای سرطانی پروستات پرداختند. آنها نشان دادند که عصاره مذکور می تواند از طریق قطعه قطعه شدن DNA باعث القاء آپوپتوزیس بر روی سلولهای سرطانی پروستات داشته باشد که این امر وابسته به دوز بود. محققین فوق اثر آپوپتوتیک گیاه مذکور را به وجود ترکیب *Chalcone Cardamonin* آنالیز شده از گیاه فوق نسبت دادند (۱۴۶). در تحقیقی مشابه محققین چینی در سال ۲۰۱۴ به بررسی القاء آپوپتوزیس توسط ماده *Chalcone* استخراج شده از گیاه *Cleistocalyx operculatus* (از خانواده موردیان) بر روی سلولهای کبدی پرداختند. نتایج مطالعات آنها نشان داد که ماده مذکور می تواند باعث قطعه قطعه شدن DNA، کاهش فعالیت *mRNA* و القاء آپوپتوزیس در سلولهای سرطانی کبد شود و این اثر را وابسته به دوز گزارش کردند (۱۴۷). در مطالعه ما نیز همسو با مطالعات فوق، همراه با افزایش غلظت عصاره گیاه مورد آزمایش ما، مرگ برنامه ریزی شده سلولی بر روی پروتواسکولکس های کیست هیداتید بیشتر بود. با توجه به هم خانواده بودن گیاه مورد مطالعه ما گیاهان بررسی شده فوق شاید این تشابه تأثیر مربوط به ترکیب بیواکتیو *Chalcone* در دو گیاه مورد مطالعه فوق و گیاه مورد مطالعه ما باشد که این مسئله با توجه به اختلاف سلولهای مورد مطالعه، دوزهای مورد استفاده و روشهای مختلف مطالعاتی، نیاز به بررسی های بیشتری داشته باشد.

برخی از محققین در سال ۲۰۱۵ به بررسی القاء آپوپتوزیس عصاره گیاه *Leptospermum flavescens* معروف به سنای مکی (از خانواده موردیان)، بر روی سلولهای سرطانی ریه انسان پرداختند. نتایج آنها نشان داد که این گیاه اثرات سایتوتوکسیک موثری بر روی سلولهای سرطانی ریه داشته و باعث توقف چرخه سلولی در فاز G0/G1 می شود و همچنین نشان دادند که گیاه مذکور می تواند باعث القاء آپوپتوزیس و افزایش فعالیت

کاسپاز ۳ گردد که این امر وابسته به دوز بود (۱۴۸). در مطالعه حاضر نیز اثرات آپوپتوتیک عصاره گیاه مورد بر روی پروتواسکولکس های کیست هیداتید و وابسته به غلظت بودن اثر مذکور، می تواند با توجه به هم خانواده بودن این گیاه با گیاه فوق باشد. از طرف دیگر همسو با مطالعه فوق، در بررسی ما نیز افزایش فعالیت کاسپاز ۳ نشان داده شد.

Hsieh و همکاران در سال ۲۰۰۷ به مطالعه آپوپتوتیک عصاره آبی گیاه *Psidium guajava* از خانواده موردیان (Myrtaceae) بر روی سلولهای اندوتلیال بند ناف انسان پرداختند. نتایج بدست آمده نشان داد که عصاره گیاه مذکور می تواند با فعال سازی فاکتورهای هسته ای، باعث آپوپتوزیس سلولهای اندوتلیال شود و این اثرات را به مواد پلی فنلی جدا شده از آن نسبت دادند (۱۴۹). در تحقیق ما نیز عصاره گیاه مورد توانست بر روی پروتواسکولکس های کیست هیداتید اثر آپوپتوتیک داشته باشد. هم خانواده بودن گیاه مورد مطالعه ما و گیاه فوق الذکر و داشتن ترکیبات مشابه (پلی فنل) در هر دو گیاه می تواند توجیه گر اثر آپوپتوتیک عصاره گیاه مورد بر روی پروتواسکولکس ها باشد که این مسئله با توجه به تنوع ترکیبات گیاهان مذکور و اثر افزایشی و کاهشی آنها بر روی همدیگر نیازمند تحقیقات بیشتر است.

برخی محققان چینی در سال ۲۰۱۶ به بررسی القاء آپوپتوزیس ترکیبات گیاه *Zanthoxylum bungeanum* بر روی سلولهای سرطانی پوست پرداختند. مطالعات آنها نشان داد که ترکیبات گیاه مذکور می تواند بصورت وابسته به دوز باعث مهار تکثیر سلولهای سرطانی شود. همچنین گزارش کردند که عصاره گیاه مذکور می تواند باعث توقف چرخه سلولی در فاز S، افزایش فعالیت کاسپازهای ۳، ۸ و ۹، افزایش بیان Bax و کاهش سطح Bcl-2 در سلولهای سرطانی گردند و در نتیجه باعث القاء آپوپتوزیس از هر دو مسیر داخلی و خارجی شوند. محققین فوق اثرات مذکور را به ترکیبات آنالیز شده گیاه مذکور از جمله *Limonene* و *Terpinen* نسبت دادند (۱۵۰). در تحقیق حاضر نیز عصاره گیاه مورد آزمایش به صورت وابسته به دوز توانست باعث مرگ پروتواسکولکس های کیست هیداتید و افزایش فعالیت کاسپاز های ۳ و ۹ شود. با توجه به

وجود ترکیبات لیمونن و تربینن در گیاه مورد مطالعه ما و گیاه فوق، این تشابه در القاء آپوپتوتیک را می توان به وجود ترکیبات فوق در ۲ گیاه نسبت داد. برخلاف مطالعه فوق در مطالعه ما، عصاره گیاه مورد بر روی فعالیت کاسپاز ۸ تاثیری نداشت که این تفاوت را می توان ناشی از اختلاف در نوع گیاه، نوع سلول مورد مواجهه و مسیرهای مورد بررسی دانست که مطالعات تکمیلی را طلب می کند.

محققین چینی در سال ۲۰۱۴ به بررسی اثر مهار رشد سلولی و القاء آپوپتوزیس توسط ماده ای بنام 4-*Terpineol* بر روی سلولهای سرطانی کبد پرداختند. در این مطالعه ماده مذکور را با غلظت های مختلف (۴۰، ۸۰، ۱۶۰، ۲۳۰ و ۶۴۰ میکروگرم در میلی لیتر) به مدت ۴۸ ساعت با سلولهای سرطانی فوق مواجه کردند و با استفاده از آزمون قطعه قطعه شدن DNA و روش فلوسایتومتری به بررسی آپوپتوزیس پرداختند. نتایج آنها نشان داد که ماده مذکور می تواند باعث القاء آپوپتوز بر روی سلولهای سرطانی شود که این امر را وابسته به دوز و زمان گزارش کردند (۱۵۱). در مطالعه حاضر نیز با افزایش غلظت عصاره گیاه مورد، افزایش مرگ سلولی پروتواسکولکس ها را داشتیم . از آنجا که ماده *Terpineol* در گیاه مورد آزمایش ما نیز وجود دارد، لذا این تشابه تاثیر را می توان به وجود ماده مذکور در عصاره گیاه مورد نسبت داد که این مسئله نیاز به تحقیق بیشتری دارد.

برخی محققین به بررسی القاء آپوپتوزیس توسط کریسین (*Chrysin*) (یک نوع فلاونوئید گیاهی موجود در عسل و برخی از گیاهان)، با غلظت های مختلف (۰، ۱۰، ۳۰ و ۱۰۰ میکرومول) بر روی سلولهای بدخیم ملانوما در چشم پرداختند. نتایج آنها نشان داد که ماده مذکور می تواند در غلظت های ۳۰ و ۱۰۰ میکرومول باعث کاهش ویابیلیتی سلولهای سرطانی ملانوما شده و باعث افزایش نفوذ پذیری میتوکندری و آزاد سازی سیتوکروم C و افزایش فعالیت کاسپاز های ۳ و ۹ شود که این امر با افزایش غلظت ارتباط مستقیم داشت. در بررسی فوق، هیچ افزایشی در فعالیت کاسپاز ۸ دیده نشد (۱۵۲). در تحقیق ما نیز همسو با مطالعه فوق عصاره گیاه مورد توانست باعث افزایش فعالیت کاسپازهای ۳ و ۹ گردد و هیچ تأثیری بر روی فعالیت کاسپاز ۸

نداشت. از آنجا که فلاونوئید یک ترکیب موجود در گیاه مورد مطالعه ما نیز می باشد، لذا می توان این تشابه تاثیر را به وجود ماده مذکور در گیاه مورد مطالعه ما دانست که نیازمند تحقیق بیشتری می باشد. ضمناً در بررسی ما نیز همچون مطالعه فوق اثر آپوپتوتیک عصاره گیاه بر روی پروتواسکولکس ها وابسته به دوز بود.

علاوه بر تحقیقات فوق، بررسی های دیگری در مورد مکانیسم های مختلف آپوپتوزیس بر روی پروتواسکولکس ها صورت گرفته است، چنانکه اسپوتین و همکاران (۱۳۹۱)، طی تحقیقی بیان مولکول های القاء کننده آپوپتوزیس Fas-L، TRAIL در سطح لایه ژرمینال کیست هیداتیک نابارور و کیست بارور و بافت سالم اطراف آن را مورد بررسی قرار دادند و بیان مولکول های القاء کننده آپوپتوزیس در کیست های نابارور در مقایسه با کیست های بارور و بافت سالم را در سطح نسبتاً بالایی یافتند و احتمال آپوپتوزیس بر علیه لایه ژرمینال کیست بارور را به عنوان یکی از مسیرهای مهم در نابارور شدن کیست ها گزارش کردند (۱۵۳). در تحقیقی دیگر Parades و همکاران نیز در سال ۲۰۰۷ احتمال آپوپتوزیس در باروری و غیر باروری کیست های هیداتیک را با استفاده از آنالیز قطعات DNA مورد بررسی قرار دادند و مشاهده کردند سطح آپوپتوزیس در کیست های غیربارور بیشتر است (۱۰). همچنین در تحقیقات دیگر نیز اثر مواد مختلف از جمله دگزامتازون، H_2O_2 و پرازی کوانتل بعنوان عامل آپوپتوزیس در پروتواسکولکس ها گزارش شده (۱۵۴-۱۵۶) که با توجه به پروتواسکولیسیدال بودن مواد فوق، گیاهان دارویی و ترکیبات متنوع مورد بررسی توسط محققین مختلف و همچنین اثر اسکولیسیدالی گیاه دارویی مورد مطالعه (مورد) در تحقیقات قبلی (۱۳۲)، اثر آپوپتوتیک گیاه مورد بررسی ما بر روی پروتواسکولکس ها بیشتر توجه می گردد و بررسی بیشتر جزئیات مسئله در آینده را طلب می کند.

نتیجه گیری

عصاره گیاه مورد در تمامی غلظت های مورد استفاده بر روی پروتواسکولکس های کیست هیداتید، توانست همراه با افزایش فعالیت کاسپاز های ۳ و ۹ باعث مرگ سلولی برنامه ریزی شده در پروتواسکولکس ها شود که اثرات مذکور فقط در غلظت های بالاتر (۵۰mg/ml و ۱۰۰) معنی دار بود.

پیشنهادهات

با توجه به اثر آپوپتوتیک غلظت های بالای عصاره گیاه مورد بر روی پروتواسکولکس های کیست هیداتید و همچنین تاثیر آن در افزایش کاسپاز های ۳ و ۹ انجام تحقیقات ذیل در آینده پیشنهاد می شود.

۱. بررسی اثر آپوپتوتیک عصاره گیاه مورد بر روی پروتواسکولکس های کیست هیداتید در شرایط درون تنی.
۲. بررسی اثر آپوپتوتیک فراکشن های مختلف گیاه مورد بر روی پروتواسکولکس های کیست هیداتید در شرایط برون تنی و درون تنی.
۳. بررسی اثر آپوپتوتیک ترکیبات موجود در گیاه مورد از جمله لیمونن و ترپینن بر روی پروتواسکولکس های کیست هیداتید.
۴. بررسی اثر آپوپتوتیک عصاره گیاه مورد و فراکشن های آن بر روی ژنوتیپ های مختلف پروتواسکولکس های کیست هیداتید.

فصل هفتم

فهرست منابع:

1. Sadjjadi SM. Present situation of echinococcosis in the Middle East and Arabic North Africa. *ParasitolInt* 2006; 55:S197-202.
2. Eckert J, Deplazes P. Biological, epidemiological, and clinical aspects of echinococcosis, a zoonosis of increasing concern. *Clin Microbiol Rev* 2004; 17: 107-135.
3. McManus DP, Zhang W, Li J, Bartley PB. Echinococcosis. *Lancet*.2003; 362: 1295-304.
4. Rokni MB. The present status of human helminthic diseases in Iran. *Ann Trop Med Parasitol*2008; 102(4): 283-95.
5. Adas G, Aarikan S, Kemik O, Oner A, Sahip N, Karatepe O. Use of albendazolesulfoxide, albendazolesulfone, and combined solutions as scolical agents on hydatid cysts (in vitro study). *World J Gastroenterol* 2009; 15: 112–6.
6. Topcu O, Aydin C, Arici S, Duman M, Sen M, koyoncu A. The effects of various scolical agents on the hepatopancreatic biliary system. *Visc Med* 2006; 22 (3):185–90.
7. Puryan K, Karadayi K, Topcu O, Canbay E, Sumer Z, Turan M, Karayalcin K, Sen M. Chlorhexidinegluconate: an ideal scolical agent in the treatment of intraperitonealhydatidosis. *World J Surg* 2005; 29(2): 227-30.
8. Moazeni M, Nazer A. In vitro lethal effect of *Zingiberofficinale R.* on protoscolices of hydatid cyst from sheep liver. *Microbiol Res* 2011; 2(25): 91-4.
9. Harris JC, Plummer S, Turner MP, Lloyd D. The microaerophilic flagellate *Giardia intestinalis*: *Allium sativum* (garlic) is an effective anti giardial. *Microbiology* 2000; 146(12): 3119-27.
10. Paredes R, Jimenez V, Cabrera G, Iragüen D, Galanti N. Apoptosis as a possible mechanism of infertility in *Echinococcus granulosus* hydatid cysts. *J Cell Biochem* 2007; 100(5):1200-9.
11. Verbrugge I, De Vries E, Tait SW, Wissink EH, Walczak H, Verheij M, Borst J. Ionizing radiation modulates the TRAIL death-inducing signaling complex, allowing by pass of the mitochondrial apoptosis pathway. *Oncogene* 2008; 27(5): 574-84.
12. Hu H, Jinfeng K, Chen R, Mamuti W, Wu G, Yuan W. Drug-induced apoptosis of *Echinococcus granulosus* protoscolices. *Parasitol Res* 2011; 109: 453–9.
13. Torgerson PR, Budke CM. Echinococcosis—an international public health challenge. *Res Vet Sci* 2003; 74(3):191-202.

14. Craig PS, McManus DP, Lightowlers MW, Chabalgoity JA, Garcia HH, Gavidia CM, Gilman RH, Gonzalez AE, Lorca M, Naquira C, Nieto A. Prevention and control of cystic echinococcosis. *Lancet Infect Dis* 2007; 7(6): 385-94.
15. Giri S, Parija SC. A review on diagnostic and preventive aspects of cystic echinococcosis and human cysticercosis. *Trop Parasitol* 2012; 2(2): 99-108.
16. Harandi MF, Budke CM, Rostami S. The monetary burden of cystic echinococcosis in Iran. *PLoS Negl Trop Dis* 2012; 6(11):1-10.
17. Devi CS, Parija SC. A new serum hydatid antigen detection test for diagnosis of cystic echinococcosis. *Am J Trop Med Hyg* 2003; 69(5): 525-8.
18. Thompson RA, McManus DP. Towards a taxonomic revision of the genus *Echinococcus*. *Trend Parasitol* 2002; 18(10): 452-7.
19. Wahlers K, Menezes CN, Wong ML, Zeyhle E, Ahmed ME, Ocaido M, Stijns C, Romig T, Kern P, Grobusch MP. Cystic echinococcosis in sub-Saharan Africa. *Lancet Infect Dis* 2012; 12(11): 871-80.
20. Xiao N, Qiu J, Nakao M, Li T, Yang W, Chen X, Schantz PM, Craig PS, Ito A. *Echinococcus shiquicus*, a new species from the Qinghai–Tibet plateau region of China: discovery and epidemiological implications. *Parasitol Int* 2006; 55: S233-6.
۲۱. مهبد اس ع، رضائیان م. انگل شناسی پزشکی مارکل، انتشارات تیمورزاده. ۱۳۸۵: ۲۲۴-۲۲۰.
۲۲. ارفع ف، کرم شناسی پزشکی، انتشارات خسروی. چاپ اول. ۱۳۸۶: ۱۰۶-۹۷.
23. Moro P, Schantz PM. Echinococcosis: a review. *Int J Infect Dis* 2009; 13(2): 125-33.
24. Acosta-Jamett G, Cleaveland S, Cunningham AA, Barend M, Craig PS. *Echinococcus granulosus* infection in humans and livestock in the Coquimbo region, north-central Chile. *Vet parasitol* 2010; 169(1): 102-10.
25. Mandal S, Mandal MD. Human cystic echinococcosis: epidemiologic, zoonotic, clinical, diagnostic and therapeutic aspects. *Asian Pac J Trop Med* 2012; 5(4): 253-60.
26. Thompson RCA. Biology and systematics of echinococcus. *Adv Parasitol* 2016; 95:65-109.
27. Cardona GA, Carmena D. A review of the global prevalence, molecular epidemiology and economics of cystic echinococcosis in production animals. *Vet Parasitol* 2013; 192(1): 10-32.
28. Dakkak A. Echinococcosis/hydatidosis: a severe threat in Mediterranean countries. *Vet Parasitol* 2010; 174(1): 2-11.
29. Magambo J, Njoroge E, Zeyhle E. Epidemiology and control of echinococcosis in sub-Saharan Africa. *Parasitol Int* 2006; 55: S193-5.
30. Romig T, Omer RA, Zeyhle E, Hüttner M, Dinkel A, Siefert L, Elmahdi IE, Magambo J, Ocaido M, Menezes CN, Ahmed ME. Echinococcosis in sub-Saharan Africa: emerging complexity. *Vet parasitol* 2011; 181(1): 43-7.

31. Carmena D, Cardona GA. Echinococcosis in wild carnivorous species: epidemiology, genotypic diversity, and implications for veterinary public health. *Vet parasitol* 2014; 202(3): 69-94.
32. Hüttner M, Romig T. Echinococcus species in African wildlife. *Parasitology* 2009; 136(10): 1089-95.
33. Zhang W, Zhang Z, Wu W, Shi B, Li J, Zhou X, Wen H, McManus DP. Epidemiology and control of echinococcosis in central Asia, with particular reference to the People's Republic of China. *Acta Trop* 2015; 141: 235-43.
34. Torgerson PR, Oguljahan B, Muminov AE, Karaeva RR, Kuttubaev OT, Aminjanov M, Shaikenov B. Present situation of cystic echinococcosis in Central Asia. *ParasitolInt* 2006; 55: S207-12.
35. Zhenghuan W, Xiaoming W, Xiaoqing L. Echinococcosis in China, a review of the epidemiology of Echinococcus spp. *Ecohealth* 2008; 5(2): 115-26.
36. Dar FK, Alkarmi T. Public health aspects of cystic echinococcosis in the Arab countries. *Acta Trop* 1997; 67(1-2): 125-32.
37. Seimenis A. Overview of the epidemiological situation on echinococcosis in the Mediterranean region. *Acta Trop* 2003; 85(2): 191-5.
38. Abdybekova AM, Torgerson PR. Frequency distributions of helminths of wolves in Kazakhstan. *Vet parasitol* 2012; 184(2): 348-51.
39. Dalimi A, Motamedi G, Hosseini M, Mohammadian B, Malaki H, Ghamari Z, Ghaffari Far F. Echinococcosis/hydatidosis in western Iran. *Vet parasitol* 2002; 105(2): 161-71.
40. Romig T, Dinkel A, Mackenstedt U. The present situation of echinococcosis in Europe. *ParasitolInt* 2006; 55: S187-S91.
41. Moro P, Schantz PM. Cystic echinococcosis in the Americas. *Parasitol Int* 2006; 55: S181-6.
42. Carmena D, Cardona GA. Canine echinococcosis: global epidemiology and genotypic diversity. *Acta Trop* 2013; 128(3): 441-60.
43. Jenkins DJ. Hydatid control in Australia: where it began, what we have achieved and where to from here. *Int J parasitol* 2005; 35(7): 733-40.
44. Ahmadi N, Dalimi A. Characterization of *Echinococcus granulosus* isolates from human, sheep and camel in Iran. *Infect Genet Evol* 2006; 6(2): 85-90.
45. Wachira TM, Macpherson CN, Gathuma JM. Release and survival of Echinococcus eggs in different environments in Turkana, and their possible impact on the incidence of hydatidosis in man and livestock. *J helminthol* 1991; 65(1): 55-61.
46. Ahmadi NA. Hydatidosis in camels (*Camelus dromedarius*) and their potential role in the epidemiology of *Echinococcus granulosus* in Iran. *J Helminthol* 2005; 79(2): 119-25.
47. Rokni MB. Echinococcosis/hydatidosis in Iran. *Iran J Parasitol* 2009; 4(2): 1-6.

48. Dalimi A, Sattari A, Motamedi GH. A study on intestinal helminthes of dogs, foxes and jackals in the western part of Iran. Vet parasitol 2006; 142(1): 129-33.

۴۹- غرقى ب، يـخچالى م. بررسى ميزان شيوع هيداتيـدوزيس در نشخواركنندگان كشتار شده در شهرستان بانه (استان كردستان). مجله دامپزشكى ايران (دانشگاه شهيد چمران اهواز). دوره ۱۰. شماره ۱. بهار ۱۳۸۵: ۸۸-۹۵.

۵۰. توكلـى ح ر، باهنر ع، جنيدى ن. اپيدميولوژى بيمارى هيداتيـدوز در طى سال هاى ۱۳۸۱ تا ۱۳۸۵. فصلنامه بيمارى هاى عفونى و گرمسـيرى وابسته به انجمن متخصصين بيمارى هاى عفونى و گرمسـيرى. دوره سيزدهم. شماره ۴۲. پايـيز ۱۳۸۷: ۶۷-۷۱.

۵۱. مردانى ا. باباخان ل. وضعيت اپيدميولوژى بيماران مبتلا به كيسـت هيداتيـد جراحى شده در بيمارستان هاى شهر قم طى سالهاى ۱۳۸۳ تا ۱۳۸۶. مجله علوم آزمائـشگاهى. دوره سوم. شماره ۲. پايـيز و زمستان ۱۳۸۸: ۷-۱۰.

۵۲. اخلاقى ل، اورمزدى ه، سرورى ش، رزمجو ا، شكرابى م، سياوشى م ر، بيرم وند م، تولا م. بررسى فراوانى هيداتيـدوز انساني در مراجعين به مراكز انتقال خون تهران با استفاده از روش ELISA-Dot در سال ۸۶-۱۳۸۵. مجله دانشگاه علوم پزشكى ايران. دوره شانزدهم. شماره ۶۷. دى ماه ۱۳۸۸: ۵۹-۵۲.

53. Sadjjadi SM, Abidi H, Sarkari B, Izadpanah A, Kazemian S. Evaluation of enzyme linked immunosorbent assay, utilizing native antigen B for serodiagnosis of human hydatidosis. Iran J Immunol 2007; 4(3): 167-72.

54. Sharafi SM, Rostami-Nejad M, Moazeni M, Yousefi M, Saneie B, Hosseini-Safa A, Yousofi-Darani H. *Echinococcus granulosus* genotypes in Iran. Gastroenterol Hepatol Bed Bench 2014; 7(2): 82.

۵۵- صائـبى ا. بيمارى هاى انگلى در ايران، انتشارات آيـيـژ. چاپ اول. ۱۳۹۳: ۱۷۰-۱۴۸.

۵۶. موزنى م. نـگاهى به تجربيات كشورهاي ديگر در زمينه كنترل كيسـت هيداتيـد. مجله دانشكده پيراپزشكى دانشگاه علوم پزشكى تهران. دوره ۱. شماره ۲. زمستان ۱۳۸۶: ۱۹-۱۱.

57. Geramizadeh B. Unusual locations of the hydatid cyst: a review from Iran. Iran J Med Sci 2013; 38(1): 2-14.

۵۸. آقاجان زاده م، دلشاد م. علايم و نشانه هاى بالينى و پيامد درمان در كيسـت هيداتيـد ريوى عارضه دار. مجله دانشگاه علوم پزشكى گيلان. دوره ۱۸. شماره ۷۰. پايـيز ۹۲: ۴۹-۴۴.

59. Frider B, Larrieu E, Odriozola M. Long-term outcome of asymptomatic liver hydatidosis. J Hepatol 1999; 30(2): 228-31.

60. Ramos G, Orduña A, García-Yuste M. Hydatid cyst of the lung: diagnosis and treatment. World J surg 2001; 25(1): 46-57.

61. Barnes TS, Deplazes P, Gottstein B, Jenkins DJ, Mathis A, Siles-Lucas M, Torgerson PR, Ziadinov I, Heath DD. Challenges for diagnosis and control of cystic hydatid disease. Acta Trop 2012; 123(1): 1-7.

62. Babba H, Messedi A, Masmoudi S, Zribi M, Grillot R, Ambriose-Thomas P, Beyrouiti I, Sahnoun Y. Diagnosis of human hydatidosis: comparison between imagery and six serologic techniques. *Am J Trop Med Hyg* 1994; 50(1): 64-8.
63. Kanwar JR, Kaushik SP, Sawhney IM, Kamboj MS, Mehta SK, Vinayak VK. Specific antibodies in serum of patients with hydatidosis recognised by immunoblotting. *J Med Microbiol* 1992; 36(1): 46-51.
64. Pedrosa I, Saiz A, Arrazola J, Ferreirós J, Pedrosa CS. Hydatid Disease: radiologic and pathologic features and complications. *Radiographics* 2000; 20(3): 795-817.
65. Turgut AT, Akhan O, Bhatt S, Dogra VS. Sonographic spectrum of hydatid disease. *Ultrasound Q* 2008; 24(1): 17-29.
66. Macpherson CN, Zeyhle E, Romig T, Rees PH, Were JB. Portable ultrasound scanner versus serology in screening for hydatid cysts in a nomadic population. *Lancet* 1987; 330(8553): 259-61.
67. Siracusano A, Teggi A, Ortona E. Human cystic echinococcosis: old problems and new perspectives. *Interdiscip Perspect Infect Dis* 2009; 1-7.
68. El-Shamam O, Amer T, El-Atta MA. Magnetic resonance imaging of simple and infected hydatid cysts of the brain. *Magn Reson Imaging* 2001; 19(7): 965-74.
69. Duewell S, Marincek B, von Schulthess GK, Ammann R. MRT and CT in alveolar echinococcosis of the liver. *RoFo: Fortschritte auf dem Gebiete der Röntgenstrahlen und der Nuklearmedizin*. 1990; 152(4): 441-5.
70. Gadea I, Ayala G, Diago MT, Cunat A, de Lomas JG. Immunological diagnosis of human cystic echinococcosis: utility of discriminant analysis applied to the enzyme-linked immunoelectrotransfer blot. *Clin Diagn Lab Immunol* 1999; 6(4): 504-8.
71. Farag H, Bout D, Capron A. Specific immunodiagnosis of human hydatidosis by the enzyme linked immunosorbent assay (ELISA.). *Biomedicine* 1975; 23(7): 276-8.
72. Coltorti EA. Standardization and evaluation of an enzyme immune assay as a screening test for the seroepidemiology of human hydatidosis. *Am J Trop Med Hyg* 1986; 35(5): 1000-5.
73. Coltorti EA, Varela-Diaz VM. Detection of antibodies against *Echinococcus granulosus* arc 5 antigens by double diffusion test. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1978; 72(3): 226-9.
74. Maddison SE, Slemenda SB, Schantz PM, Fried JA, Wilson M, Tsang VC. A specific diagnostic antigen of *Echinococcus granulosus* with an apparent molecular weight of 8 kDa. *Am J Trop Med Hyg* 1989; 40(4): 377-83.
75. Schantz PM, Shanks D, Wilson M. Serologic cross-reaction with sera from patients with Echinococcosis and cysticercosis. *Am J Trop Med Hyg* 1980; 29:609-612.
76. Mikaeili F, Fakhar M, Sarkari B, Motazedian MH, Hatam G. Comparison of serological methods (ELISA, DAT and IFA) for diagnosis of visceral leishmaniasis utilizing an endemic strain. *Iran J Immunol* 2007; 4(2): 116-21.

77. Garabedian GA, Matossian RM, Djanian AY. An indirect hemagglutination test for hydatid disease. *J Immunol* 1957; 78(4): 269-72.
78. Ravinder PT, Parija SC, Rao KS. Urinary hydatid antigen detection by coagglutination, a cost-effective and rapid test for diagnosis of cystic echinococcosis in a rural or field setting. *J Clin Microbiol* 2000; 38(8): 2972-4.
79. Burnette WN. "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal biochem* 1981; 112(2): 195-203.
80. Savardashtaki A, Sarkari B, Arianfar F, Mostafavi-Pour Z. Immunodiagnostic value of *Echinococcus granulosus* recombinant B8/1 subunit of antigen B. *Iran J Immunol* 2017; 14(2): 111-22.
81. Zhang W, McManus DP. Recent advances in the immunology and diagnosis of echinococcosis. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2006; 47(1): 24-41.
82. Gottstein BR. Molecular and immunological diagnosis of echinococcosis. *Clin Microbiol Rev* 1992; 5(3): 248-61.
83. Bygott JM, Chiodini PL. Praziquantel: neglected drug? Ineffective treatment? Or therapeutic choice in cystic hydatid disease? *Acta Tropica* 2009; 111(2): 95-101.
84. Stamatakis M, Sargedi C, Stefanaki C, Safioleas C, Matthaiopoulou I, Safioleas M. Anthelmintic treatment: an adjuvant therapeutic strategy against *Echinococcus granulosus*. *Parasitol Int* 2009; 58(2): 115-20.
۸۵. جعفری ا. ارزیابی میزان باروری کیست هیداتید و ویبیلیتی پروتواسکولکس ها. پایان نامه جهت اخذ درجه دکتری عمومی. دانشکده پزشکی شهید بابایی قزوین، ۸۸-۱۳۸۷.
۸۶. غفاری فر. ف. اکینوкокوس گرانولوزوس و بررسی مبتلایان به کیست هیداتید، انتشارات پیوند مهر. چاپ اول. تهران. ۱۳۸۸: ۷۹-۹۱.
87. Rigano R, Profumo E, Bruschi F, Carulli G, Azzara A, Ioppolo S, Buttari B, Ortona E, Margutti P, Teggi A, Siracusano A. Modulation of human immune response by *Echinococcus granulosus* antigen B and its possible role in evading host defenses. *Infect Immun* 2001; 69(1): 288-96.
۸۸. محمود زاده پورناکی ع. تهیه و تخلیص و ارزشیابی اختصاصی کیست هیداتید و کاربرد آن در تست های سرمی، پایان نامه جهت اخذ درجه دکتری انگل شناسی، دانشکده پزشکی دانشگاه تربیت مدرس، ۷۳-۱۳۷۲.
89. Grimm F, Maly FE, Lü J, Llano R. Analysis of specific immunoglobulin G subclass antibodies for serological diagnosis of echinococcosis by a standard enzyme-linked immunosorbent assay. *J Microbiol* 1998; 5(5): 613-6.
90. Joao H, Kanan C, Benjamin M. Modulation of dendritic cell differentiation and cytokine secretion by the hydatid cyst fluid of *Echinococcus granulosus*. *Immunology* 2006; 118(2): 271-8.
91. Bayraktar MR, Mehmet N, Durmaz R. Th1 and Th2 inducing cytokines in cystic echinococcosis. *Turkiye Parazit Derg* 2005; 29(3): 167-70.

92. Riffkin M, Seow HF, Jackson D, Brown L, Wood P. Defence against the immune barrage: helminth survival strategies. *Immunol Cell Biol* 1996; 74: 564-74.
93. Siracusano A, Delunardo F, Teggi A, Ortona E. Cystic echinococcosis: aspects of immune response, immunopathogenesis and immune evasion from the human host. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets* 2012; 12(1): 16-23.
94. Rigano R, Profumo E, Teggi A, Siracusano A. Production of IL-5 and IL-6 by peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from patients with *Echinococcus granulosus* infection. *Clin Exp Immunol* 1996; 105(3): 456-9.
۹۵. هاشمی م، قوامی س، کرمی تهرانی ف. آپوپتوز، مرگ برنامه ریزی شده سلول. مجله تحقیقات علوم پزشکی زاهدان. دوره ۵. شماره ۱. فروردین ۱۳۸۲: ۹-۱۵.
96. Israels LG, Israels ED. Apoptosis. *Oncologist* 1999; 4(4): 332-9.
97. Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 1995; 267(5203): 1456-62.
98. Ashkenazi A, Dixit VM. Death receptors: signaling and modulation. *Science* 1998; 281(5381): 1305-8.
99. Bratton SB, MacFarlane M, Cain K, Cohen GM. Protein complexes activate distinct caspase cascades in death receptor and stress-induced apoptosis. *Exp cell Res* 2000; 256(1): 27-33.
100. Kaufmann SH, Hengartner MO. Programmed cell death: Alive and well in the new millennium. *Trends Cell Biol* 2001; 11:526-34.
101. Hansen TM, Nagley P. AIF: a multifunctional cog in the life and death machine. *Sci STKE* 2003(193): PE31.
102. Köhler C, Orrenius S, Zhivotovsky B. Evaluation of caspase activity in apoptotic cells. *J Immun Methods* 2002; 265(1): 97-110.
103. Zibaei M, Sarlak A, Delfan B, Ezatpour B, Azargoon A. Scolicidal effects of *Olea europaea* and *Satureja khuzestanica* extracts on protoscolices of hydatid cysts. *Korean J Parasitol* 2012; 50(1): 53-6.
104. Moazeni M, Nazer A. In vitro effectiveness of garlic (*Allium sativum*) extract on scolices of hydatid cyst. *World J Surg* 2010; 34: 2677-81.
105. Moazeni M, Saharkhiz MJ, Hosseini AA. In vitro lethal effect of ajowan (*Trachyspermum ammi* L.) essential oil on hydatid cyst protoscoleces. *Vet Parasitol* 2012; 187(1-2): 203-8.
106. Rouhani S, Salehi N, Kamalinejad M, Zayeri F. Efficacy of *Berberis vulgaris* aqueous extract on viability of *Echinococcus granulosus* protoscolices. *J Invest Surg* 2013; 26: 347-51.
107. Mamuti W, Sako Y, Nakao M, Xiao N, Nakaya K, Ishikawa Y, Yamasaki H, Lightowlers MW, Ito A. Recent advances in characterization of Echinococcus antigen B. *Parasitol Int* 2006; 55: S57-62.
108. Kanan JH, Chain BM. Modulation of dendritic cell differentiation and cytokine secretion by the hydatid cyst fluid of *Echinococcus granulosus*. *Immunology* 2006; 118(2): 271-8.

109. Formigli L, Conti A, Lippi D. "Falling leaves": a survey of the history of apoptosis. *Minerva Med* 2004; 95(2): 159-64.
110. Cliffe LJ, Potten CS, Booth CE, Grencis RK. An increase in epithelial cell apoptosis is associated with chronic intestinal nematode infection. *Infect Immun* 2007; 75(4): 1556-64.
111. Gupta S. Molecular steps of death receptor and mitochondrial pathways of apoptosis. *Life sci* 2001; 69(25-26): 2957-64.
112. Zimmermann KC, Bonzon C, Green DR. The machinery of programmed cell death. *Pharmacol Ther* 2001; 92: 57-70.
113. Wong WW, Puthalakath H. Bcl-2 family proteins: the sentinels of the mitochondrial apoptosis pathway. *IUBMB Life* 2008; 60(6): 390-7.
114. Kolomecki K, Maciaszczyk P, Stepień H, Stepień T, Kuzdak K, Ulanska J. P53 concentration and soluble FasL (sFasL) serum level as indicators of apoptosis in patients with benign and malignant thyroid tumors. *Bratisl Lek Listy* 2005; 106(10): 297.
115. Weil M, Jacobson MD, Coles HS, Davies TJ, Gardner RL, Raff KD, Raff MC. Constitutive expression of the machinery for programmed cell death. *J Cell Biol* 1996; 33: 1053-59.
116. Zangger H, Mottram JC, Fasel N. Cell death in *Leishmania* induced by stress and differentiation: Pro- grammed cell death or necrosis? *Cell Death Differ* 2002; 9: 1126-39.
117. Huang X, Halicka HD, Traganos F, Tanaka T, Kurose A, Darzynkiewicz Z. Cytometric assessment of DNA damage in relation to cell cycle phase and apoptosis. *Cell Prolif* 2005; 38: 223-43.
118. Carneiro-Santos P, Martins-Filho O, ves-Oliveira LF, Silveira AM, Coura-Filho P, Viana IR, Wilson RA, Correa-Oliveira R. Apoptosis: a mechanism of immunoregulation during human *Schistosomiasis mansoni*. *Parasite Immunol* 2000; 22: 267-77.
119. Tato P, Fernandez AM, Solano S, Borgonio V, Garrido E, Sepulveda J, Molinari JL. A cysteine protease from *Taenia solium* metacestodes induce apoptosis in human CD4+ T-cells. *Parasitol Res* 2004; 92: 197-204.
120. Hwang JS, Kobayashi C, Agata K, Ikeo K, Gojobori T. Detection of apoptosis during planarian regeneration by the expression of apoptosis-related genes and TUNEL assay. *Gene* 2004; 333: 15-25.

۱۲۱. زرگری ع. گیاهان دارویی، انتشارات دانشگاه تهران. جلد دوم. ۱۳۷۰: ۳۰۶-۳۰۱.

۱۲۲. ناصریان ر. بررسی فتوشیمیایی و اثر ضد میکروبی اسانس وعصاره مورد (*Mrtus communis*). پایان نامه جهت اخذ درجه دکترای داروسازی. دانشگاه علوم پزشکی شیراز، ۱۳۷۶.

123. Aleksic V, Knezevic P. Antimicrobial and antioxidative activity of extracts and essential oils of *Myrtus communis* L. *Microbiol Res*. 2014; 169(4): 240-54.

۱۲۴. نائینی ع، ناصری م، کمال نژاد م، خوش زبان ف، رجبیان ط، اسماعیل زاده نامی ح، منصوری ص، زاویه د. بررسی اثرات اسانس ها و عصاره های ۵۰ گیاه دارویی ایران روی سویه ای استاندارد کاندیدا آلبیکنس در شرایط آزمایشگاهی. فصلنامه گیاهان دارویی. سال دهم. دوره دوم. بهار ۱۳۹۰: ۱۷۲-۱۶۳.

۱۲۵. راد ف، یغمایی ر، مهدی آبادی پ، خطیبی ر. مقایسه تاثیر درمانی پماد تریامسینولون موضعی داخل دهانی و محلول گیاهی مورد در درمان ضایعات آفتی مینور دهان. مجله ارمغان دانش. دوره ۱۵. شماره ۳. ۱۳۸۹: ۱۹۸-۱۹۱.

126. Sen S, Yalcin M. Activity of commercial still waters from volatile oils production against wood decay fungi. *Maderas Ciencia Tecnol* 2010;12(2):127-33.

127. Shahidi Bojnord GH. Anti bacterial activity of plants used in Iranian herbal- medicine. *Malays J Pharm Sci* 2004; 2: 39- 52.

۱۲۸. شکیبایی م، حیدری م، احمدی نژاد م، محمدی م. اثرات ضد پلاسمیدی ۵ عصاره گیاهی از گیاهان دارویی بر روی سوشهای مقاوم کلبسیلا پنومونیه. مجله دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی گیلان. سال نهم. شماره ۳۳ و ۳۴. بهار و تابستان ۱۳۷۹: ۱۰-۱.

۱۲۹. شیرازی م ح،، فاضلی م، سلطانی دلال م م، اشراقی س، جمالی فرح، علم الهدی ا. بررسی اثر ضد میکروبی ۱۰ عصاره گیاهی بر روی هلیکو باکتر پیلوری و مقایسه آن با آنتی بیوتیک های موثر انتخابی. فصلنامه گیاهان دارویی. شماره هفتم. تابستان ۱۳۸۲: ۶۰-۵۳.

۱۳۰. براتی م، شریفی ا، شریفی فر ف. بررسی اثرات ضد لیشمانیایی عصاره های آویشن و مورد با روش رنگ سنجی به صورت برون تنی (In vitro). مجله علوم پزشکی کرمان. دوره هفدهم. شماره ۱. ۱۳۸۸: ۴۱-۳۲.

۱۳۱. ضیایی هزار جریبی ه، آزاد بخت م، عبداللهی ف، شعبانخانی ب. تاثیر عصاره متانولی گیاهان درمنه کوهی، آویشن شیرازی ومورد روی تریکوموناس واژینالیس در محیط کشت. مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی گرگان. دوره هشتم. شماره ۱. بهار ۱۳۸۵: ۳۴-۳۸.

۱۳۲. لطیفی ر. بررسی اثر پروتواسکولیسیدال گیاهان دارویی و تعیین اثر ایمونومدولاتوری گیاهان پروتواسکولیسید بر روی سلولهای دندریتیک. پایان نامه جهت اخذ درجه کارشناسی ارشد. دانشگاه علوم پزشکی قزوین، ۹۴-۱۳۹۳.

133. Tretiakova I, Blaesius D, Maxia L, Wesselborg S, Schulze-Osthoff K, Cinatl J, Michaelis M, Werz O. Myrtucommulone from *Myrtus communis* induces apoptosis in cancer cells via the mitochondrial pathway involving caspase-9. *Apoptosis* 2008; 13(1): 119-31.

134. Izgi K, Iskender B, Jauch J, Sezen S, Cakir M, Charpentier M, Canatan H, Sakalar C. Myrtucommulone-A induces both extrinsic and intrinsic apoptotic pathways in cancer cells. *J Biochem Mol Toxicol* 2015; 29(9): 432-9.

135. Izgi K, Iskender B, Sakalar C, Arslanhan A, Hilal Yuksek E, Hizar E, Canatan H. Effects of epirubicin and cisplatin against 4T1 breast cancer cells are enhanced by Myrtucommulone-A. *Anticancer Agents Med Chem* 2017; 17(3): 404-14.

136. Islam F, Khatun H, Khatun M, Ali SM, Khanam JA. Growth inhibition and apoptosis of Ehrlich ascites carcinoma cells by the methanol extract of *Eucalyptus camaldulensis*. Pharm Biol 2014; 52(3): 281-90.
137. Duh PD, Chen ZT, Lee SW, Lin TP, Wang YT, Yen WJ, Kuo LF, Chu HL. Antiproliferative activity and apoptosis induction of *Eucalyptus citriodora* resin and its major bioactive compound in melanoma B16F10 cells. J Agric Food Chem 2012; 60(32): 7866-72.
138. Benyahia S, Benayache S, Benayache F, Quintana J, López M, León F, Hernández JC, Estévez F, Bermejo J. Isolation from *Eucalyptus occidentalis* and identification of a new kaempferol derivative that induces apoptosis in human myeloid leukemia cell. J Nat Prod (Gorakhpur) 2004; 67(4): 527-31.
139. Islam F, Khanam JA, Khatun M, Zuberi N, Khatun L, Kabir SR, Reza MA, Ali MM, Rabbi MA, Gopalan V, Lam AK. A p-Menth-1-ene-4, 7-diol (EC-1) from *Eucalyptus camaldulensis* Dnh. triggers apoptosis and cell cycle changes in Ehrlich ascites carcinoma cells. Phytother Res 2015 ; 29(4): 573-81.
140. Jian KL, Zhang C, Shang ZC, Yang L, Kong LY. Eucalrobosone C suppresses cell proliferation and induces ROS-dependent mitochondrial apoptosis via the p38 MAPK pathway in hepatocellular carcinoma cells. Phytomedicine 2017; 25: 71-82.
141. Barh D, Viswanathan G. *Syzygium cumini* inhibits growth and induces apoptosis in cervical cancer cell lines: a primary study. Ecancermedicalscience 2008; 2: 83.
142. Liu H, Schmitz JC, Wei J, Cao S, Beumer JH, Strychor S, Cheng L, Liu M, Wang C, Wu N, Zhao X. Clove extract inhibits tumor growth and promotes cell cycle arrest and apoptosis. Oncol Res 2014; 21(5): 247-59.
143. Islamuddin M, Sahal D, Afrin F. Apoptosis-like death in *Leishmania donovani* promastigotes induced by eugenol-rich oil of *Syzygium aromaticum*. J Med Microbiol 2014; 63(1): 74-85.
144. Jaganathan SK, Mazumdar A, Mondhe D, Mandal M. Apoptotic effect of eugenol in human colon cancer cell lines. Cell Biol Int 2011; 35(6): 607-15.
145. Bontempo P, Doto A, Miceli M, Mita L, Benedetti R, Nebbioso A, Vegliione M, Rigano D, Cioffi M, Sica V, Molinari AM. *Psidium guajava* L. anti-neoplastic effects: induction of apoptosis and cell differentiation. Cell Prolif 2012; 45(1): 22-31.
146. Pascoal AC, Ehrenfried CA, Lopez BG, de Araujo TM, Pascoal V, Gilioli R, Anhê GF, Ruiz AL, Carvalho JE, Stefanello ME, Salvador MJ. Antiproliferative activity and induction of apoptosis in PC-3 cells by the chalcone cardamonin from *Campomanesia adamantium* (Myrtaceae) in a bioactivity-guided study. Molecules 2014; 19(2): 1843-55.
147. Ye CL, Lai YF, Liu XG, Huang Q. Study on mechanism of inducing apoptosis in human hepatoma SMMC-7721 cells by DMC, a chalcone from buds of *Cleistocalyx operculatus*. Zhongguo Zhong Yao Za Zhi 2014; 39(15): 2942-6.

148. Navanesan S, Wahab NA, Manickam S, Sim KS. *Leptospermum flavesces* constituent-lf1 causes cell death through the induction of cell cycle arrest and apoptosis in human lung carcinoma cells. PloS one 2015; 10(8): e0135995.
149. Hsieh CL, Huang CN, Lin YC, Peng RY. Molecular action mechanism against apoptosis by aqueous extract from guava budding leaves elucidated with human umbilical vein endothelial cell (HUVEC) model. J Agric Food Chem 2007; 55(21): 8523-33.
150. Li K, Zhou R, Jia WW, Li Z, Li J, Zhang P, Xiao T. *Zanthoxylum bungeanum* essential oil induces apoptosis of HaCaT human keratinocytes. J Ethnopharmacol 2016; 186: 351-61.
151. Liu S, Zhao Y, Cui HF, Cao CY, Zhang YB. 4-Terpineol exhibits potent in vitro and in vivo anticancer effects in Hep-G2 hepatocellular carcinoma cells by suppressing cell migration and inducing apoptosis and sub-G1 cell cycle arrest. J BUON 2016; 21(5): 1195-1202.
152. Xue C, Chen Y, Hu DN, Iacob C, Lu C, Huang Z. Chrysin induces cell apoptosis in human uveal melanoma cells via intrinsic apoptosis. Oncol Lett 2016; 12(6): 4813-20.
153. Spotin A, MokhtariAmirmajdi M, Sankian M, Varasteh A, Vahedi F, Shamsian AA. Expression of apoptosis inducing-ligands, TRAIL and Fas-L in Hydatid Cyst Germinal Layer and Normal Tissue. J Ardabil Univ Med Sci 2012; 12(1): 7-15.
154. Kang J, Hu H, Chen R. In vitro observation on the apoptosis induced by H₂O₂ in protoscolex of *Echinococcus granulosus*. Zhongguo Ji Sheng Chong Xue Yu Ji Sheng Chong Bing Za Zhi 2008; 26(5): 332-7.
155. Kang J, Hu H, Yuan W, Wu G, Chen R, Baishanbieke W, Aisaiti k. Apoptosis induced in vitro by dexamethasone and ATP in the protoscolex of *Echinococcus granulosus*. Zhongguo Ji Sheng Chong Xue Yu Ji Sheng Chong Bing Za Zhi 2009; 27(4): 332-5.
156. De S, Pan D, Bera AK, Sreevatsava V, Bandyopadhyay S, Chaudhuri D, Kumar S, Rana T, Das S, Das SK, Suryanaryana VV, Singh MN, Bhattacharya D. In vitro assessment of praziquantel and a novel nanomaterial against protoscolices of *Echinococcus granulosus*. J helminthol 2012; 86(1): 26–9.
157. Hajiaghaee R, Monsef-Esfahani HR, Khorramizadeh MR, Saadat F, Shahverdi AR, Attar F. Inhibitory effect of aerial parts of *Scrophularia striata* on matrix metalloproteinases expression. Phytother Res. 2007; 21(12): 1127-9.
158. Haniloo A, Ghasemi F, Shikhi A, Ghavami MB. Immunoregulatory cytokine (TGF- β And IL-10) responses in mice inoculated with protoscolices and major hydatid fluid antigens of cystic echinococcosis. Iran J Parasitol 2008; 3(3): 18-23.
159. Smyth JD, Barrett NJ. Procedures for testing the viability of human hydatid cysts following surgical removal, especially after chemotherapy. Trans R Soc Trop Med Hyg 1980; 74(5): 649-52.

Evaluating the effect of *Myrtus communis* on programmed cell death in hydatid cyst protoscolices

Abstract

Background: The choice of efficient protoscolicidal agents with less harmful side effects to be used in hydatid cyst surgery is of high priority for surgeons. Today, the application of herbal drugs as replacements for chemical substances have received so much attention but despite obvious scolical effect of a number of herbal drugs including *Myrtus communis* (*M.communis*), the exact mechanism of their action that influence the consequences of the disease in patients, remains to be uncovered.

Objective: The aim of this study was to examine the possible involvement of programmed cell death strategy in hydatid cyst protoscolices following treatment with *M. communis* as an herbal medicine .

Materials and methods: Following obtaining the livers and lungs infected with hydatid cyst, the cysts contents were aseptically aspirated and protoscolices collected. Viability of protoscolices was examined by staining with 0.1% eosin solution. Evaluating the effect of *M. communis* extract on programmed cell death and increased activity of caspases 3, 8, and 9 in hydatid cyst protoscolices was conducted by treating the protoscolices with different concentration (5, 50, and 100 mg/ml) of *M. communis* extract for 4 hours at 37 °C and in 5% CO₂ ambient followed by determining the target parameters using ELISA commercial kits .

Results: The extract of *M. communis* at all concentrations led to initiation of programmed cell death in protoscolices and this effect, compared to the

negative control, was only significant by 46.65 and 55.26% at two concentrations of 50 and 100 mg/ml, respectively ($p<0.05$). Also, in experiments associated with the effect of different concentrations of *M. communis* extract on the activity of caspases 3, 8, and 9 in hydatid cyst protoscolices, it was shown that the extract at all 3 concentrations could only increase the activity of caspases 3 and 9. Moreover, a significant increase in the activity of caspase 3 was only observed at concentrations 50 and 100 mg/ml by 37 and 66.19% while a significant increase in the activity of caspase 9 at the same concentrations was observed by 20.89 and 63.67%, respectively ($p<0.05$). The extract of *M. communis* failed to demonstrate any considerable increase in the activity of caspase 8.

Conclusion: The extract of *M. communis* at 3 different concentrations could increase the activity of caspases 3 and 9 and caused programmed cell death in hydatid cyst protoscolices however, this effect was only significant at high concentrations of the extract.

Keywords: *Echinococcus granulosus*; protoscolex; *M. communis*; Programmed cell death; caspase



Qazvin University of Medical Sciences

Faculty of medicine dissertation for receiving master's

Degree in medical parasitology

Title:

Evaluating the effect of *Myrtus communis* on programmed cell death
in hydatid cyst protoscolices

Supervisors:

Dr. M. Shahnazi - Dr. A. Azadmehr

Advisors:

Dr. R. Hajiaghaee - Dr. M. Alipour

By:

Moazzam Dousti Jondabeh

2016-2017

Number thesis: 72